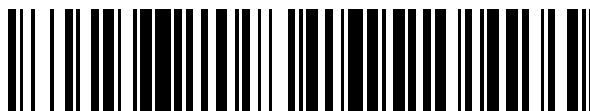


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 566 150**

51 Int. Cl.:

C12N 15/82 (2006.01)

C12N 15/55 (2006.01)

C12N 9/10 (2006.01)

A01H 5/00 (2006.01)

A01H 5/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.07.2009 E 09788255 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.03.2016 EP 2331694**

54 Título: **Plantas de girasol resistentes al herbicida**

30 Prioridad:

31.07.2008 US 85224 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

11.04.2016

73 Titular/es:

**ANGLO NETHERLANDS GRAIN BV (100.0%)
Willemsplein 492
3016 DR Rotterdam, NL**

72 Inventor/es:

**SALA, CARLOS y
BULOS, MARIANO**

74 Agente/Representante:

TOMAS GIL, Tesifonte Enrique

ES 2 566 150 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Plantas de girasol resistentes al herbicida

5 Campo de la invención

[0001] Esta presente invención se refiere al campo de la biotecnología agrícola, particularmente a plantas de girasol resistentes a los herbicidas que contienen secuencias polinucleótidas nuevas que codifican proteínas con subunidades grandes de acetohidroxiácido sintasa de girasol resistentes a los herbicidas.

10

Antecedentes

15

[0002] Acetolactato sintasa (ALS) o acetohidroxiácido sintasa (AHAS) es la primera enzima en la vía biosintética de la valina de aminoácidos de cadena ramificada, leucina e isoleucina en plantas y microorganismos. Cinco familias diferentes de compuestos inhiben la enzima de AHAS y se usan como herbicidas de amplio espectro no selectivos: sulfonilureas (SUs), imidazolinonas (IMIs), triazopirimidinas (TPS), sulfonilaminocarbonil triazolinonas (SCTs) y pirimidiniloxibenzoatos (POBs).

20

[0003] Dado su alta eficacia y baja toxicidad, ciertos herbicidas son preferidos para uso agrícola. Sin embargo, la capacidad para usar algunos de estos herbicidas en un sistema de producción de planta de cultivo particular depende de la disponibilidad de variedades resistentes de la planta de cultivo de interés. Para producir tales variedades resistentes, los criadores de plantas necesitan desarrollar líneas de cultivo con características de resistencia. Por consiguiente, líneas de cultivo resistentes al herbicida y variedades de plantas de cultivo, al igual que métodos y composiciones para la producción y uso de líneas de cultivo resistentes y variedades, son necesarias.

25

30

[0004] Una variedad de plantas de cultivo, incluyendo maíz (*Zea mays* L., canola (*Brassica napus* L.), remolacha (*Beta vulgaris* L.), arroz (*Oryza sativa* L.), algodón (*Gossypium hirsutum* L.) girasol (*Helianthus annuus* L.), lino (*Linum usitatissimum* L.), semilla de soja [*Glycine max* (L.) Merr.] y trigo (*Triticum aestivum* L.), resistente a herbicidas de inhibición de AHAS han sido desarrollados por una variedad de métodos, incluyendo selección de células somáticas, cultivo de mutación, transformación de plantas e hibridación interespecífica (Anderson and Georgeson, 1989; Croughan, 1996; D'Halluin *et al.*, 1992; Newhouse *et al.*, 1991, 1992; Hart *et al.*, 1992; Wright and Penner, 1998; Swanson *et al.*, 1989; Subramanian *et al.*, 1990; Rajasekaran *et al.*, 1996; Sebastian *et al.*, 1989; Pozniak and Hucl, 2004; Al-Khatib and Miller, 2002; Mallory-Smith *et al.*, 1990; McHughen, A. 1989). La resistencia en la mayor parte de estos casos se debe a una forma de AHAS que es menos sensible a la inhibición herbicida debido a la unión al herbicida reducida provocada por mutaciones en el gen o genes que codifican para la subunidad catalítica de AHAS. Diferentes autores han analizado mutaciones conocidas de los genes de AHAS que confieren resistencia a los herbicidas inhibidores de AHAS en plantas (Preston and Mallory-Smith, 2001; Tranel and Wright, 2002; Tan *et al.*, 2005). Ninguna sustitución de aminoácidos conocida en la subunidad reguladora se ha comunicado que confiera resistencia herbicida. La WO2007/054555 divulga girasoles con resistencia aumentada a herbicidas de imidazolinona. Estas plantas de girasol comprenden al menos una copia de AHASL con una isoleucina en la posición de aminoácido 188. La combinación con otras mutaciones tales como leucina en la posición 559 es también descrita.

40

45

[0005] Poblaciones de girasol salvaje (*Helianthus annuus* L.) resistentes a imidazolinonas (IMIs) o sulfonilureas (SUs) se han descubierto (Al-Khatib *et al.* 1998, White *et al.* 2002). La característica de resistencia al herbicida fue introgresada en las líneas innatas de élite de girasol por métodos de cultivo convencionales para el desarrollo y el despliegue de cultivos resistentes a IMI y resistentes a SU (Al-Khatib and Miller, 2002; Miller and Al-Khatib, 2002, 2004). Basándose en estudios moleculares, Kolkman *et al.* (2004) identificaron y caracterizaron tres genes de AHAS en el girasol (AHAS1, AHAS2 Y AHAS3) y demostraron que los genes resistentes a IMI y resistentes a SU eran variantes alélicas del mismo locus (AHASL1). Además, mostraron que el alelo resistente a IMI albergaba una mutación C-a-T en el codón 205 (nomenclatura de *Arabidopsis thaliana*), mientras que el alelo resistente a SU albergaba una mutación C-a-T en el codón 197 (Kolkman *et al.*, 2004).

50

Resumen

55

60

65

[0006] Se proporcionan plantas de girasol que tienen resistencia múltiple al herbicida según la reivindicación 1. Las plantas son resistentes a al menos un herbicida de imidazolinona, un herbicida de sulfonilurea, un herbicida de triazopirimidina y un herbicida de pirimidiniloxibenzoato y mezclas de estos herbicidas. Ventajosamente, las semillas de la planta tienen un contenido en aceite que es mayor del 40%, un rendimiento de semilla que es más de una tonelada por hectárea y/o una planta de girasol que tiene una única cabeza. En otras formas de realización, las plantas tienen combinaciones de estas características. En algunas formas de realización, las plantas resistentes tienen un gen de AHAS que codifica una mutación en los aminoácido 574 o su equivalente, que confiere aparentemente la característica resistente, donde la mutación puede ser la sustitución de un triptófano en esa posición con otro aminoácido, por ejemplo leucina. Formas de realización específicas incluyen plantas que contienen un gen AHASL1 que tienen la secuencia de nucleótidos expuesta en SEC ID n.º: 1, o una proteína AHASL1 que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en SEC ID n.º: 2.

[0007] Moléculas de ácidos nucleicos aislados que codifican genes de *AHASL1* mutantes también se proporcionan, por ejemplo un ácido nucleico aislado que contiene una secuencia SEC ID n.º: 1. También se proporcionan células vegetales transformadas de forma estable con un ácido nucleico que tiene la secuencia de SEC ID n.º: 1, y planta de girasol transgénica que contiene un transgén que contiene SEC ID n.º: 1. En otras formas de realización, las plantas contienen un casete de expresión que tiene un promotor activo en las plantas de girasol que está operativamente enlazado con un ácido nucleico aislado que codifica una proteína que tiene la secuencia codificada por SEC ID n.º: 1.

[0008] También se describen métodos para controlar malas hierbas que rodean una planta de girasol resistente del tipo anteriormente descrito, aplicando un herbicida a los hierbajos y a la planta de girasol, donde el herbicida es un herbicida de imidazolinona, un herbicida de sulfonilurea, un herbicida de triazolopirimidina o un herbicida de pirimidiniloxibenzoato, o mezclas de estos herbicidas.

[0009] También se proporcionan semillas de girasol y la planta crecida a partir de estas semillas. Las plantas tienen resistencia al herbicida para un herbicida de imidazolinona, un herbicida de sulfonilurea, un herbicida de triazolopirimidina, un herbicida de pirimidiniloxibenzoato y sus mezclas derivadas. En formas de realización específicas, las plantas que crecen de la semilla tienen un contenido de aceite de semilla que es superior al 40%, un rendimiento de semilla que es más de una tonelada por hectárea y/o una planta de girasol tiene una única cabeza. Otras formas de realización incluyen combinaciones de las características anteriormente mencionadas. Estas plantas pueden contener un mutante *AHASL1* como se ha descrito anteriormente.

[0010] También se han descrito métodos para mejorar la tolerancia al herbicida en una planta de girasol. Formas de realización preferidas incluyen la regeneración de una célula de girasol en una planta de girasol donde la célula de girasol es transformada con un constructo que tiene una secuencia de ácidos nucleicos que codifica de la proteína codificada por SEC ID n.º: 1, la regeneración de la célula de girasol en una planta de girasol y la selección de plantas de flor fértiles que son vegetativas y reproductivas resistentes a una dosis efectiva de herbicida. El herbicida se selecciona del grupo que consiste en una sulfonilurea, una imidazolinona, un pirimidiniloxibenzoato, una triazolopirimidina y sus mezclas derivadas.

[0011] También se proporcionan aquí métodos para producir una planta de girasol resistente al herbicida por retrocruce. Formas de realización preferidas incluyen cruce de una primera planta de girasol que tiene actividad de AHAS resistente al herbicida con una segunda planta de girasol que no tiene actividad de AHAS resistente al herbicida, donde la primera planta de girasol tiene un ácido nucleico que codifica la proteína codificada por SEC ID n.º: 1. Ventajosamente, se selecciona la progenie de las plantas que tienen actividad de AHAS resistentes al herbicida. Además, formas de realización preferidas incluyen una semilla que tiene las características resistentes al herbicida de la primera planta de girasol.

[0012] En una forma de realización específica, una semilla de cultivo de girasol denominada RW-B está provista. Esta semilla y la planta correspondiente tienen todas las características fisiológicas, resistentes a los herbicidas y morfológicas anteriormente descritas. Una semilla representativa de este cultivo de girasol se ha depositado en la *American Type Culture Collection* (ATCC) bajo número de acceso: PTA-9176.

[0013] También se ha proporcionado un cultivo de tejido de células regenerables de las plantas de girasol resistentes anteriormente mencionadas. Formas de realización preferidas incluyen cultivos de tejido donde las células del cultivo de tejido comprenden una hoja, polen, un embrión, un cotiledón, un hipocotilo, células meristemáticas, una raíz, una punta de raíz, un antera, una flor, una semilla, un vástago, óvulos, brotes, tallos, troncos, cápsulas de médula o una vaina. Plantas de girasol resistentes se pueden generar a partir del cultivo de tejido anteriormente mencionado y expresar todas las características morfológicas y fisiológicas del cultivo de girasol RW-B.

[0014] Otros objetos, características y ventajas de la presente invención se harán aparentes a partir de la siguiente descripción detallada.

Breve descripción de los dibujos

[0015]

La figura 1 muestra el alineamiento de la secuencia de ADN parcial de la región codificante del gen *AHASL1* a partir de la línea HA89, B770, la línea resistente RW-B, el gen ALS de *Xanthium sp.* y *Arabidopsis thaliana*.

La figura 2 muestra la alineación de secuencia de aminoácidos parcial de la proteína *AHASL1* a partir de la línea HA89, B770, la línea resistente RW-B, el gen ALS de *Xanthium sp.* y *Arabidopsis thaliana*.

La figura 3 muestra la herencia de resistencia a IMI en RW-B.

La figura 4 muestra el índice de fitotoxicidad de siete líneas de girasol pulverizadas con diferentes herbicidas inhibidores de AHAS en forma de tabla.

La figura 5 muestra la respuesta de plantas de girasol, resistentes (R) y susceptibles (S), a imazapir en una prueba de alelismo en generaciones F_1 , F_2 y BC_1F_1 .

La figura 6 muestra segregación del haplotipo *AHAS1* y la reacción de plantas de girasol, resistentes (R) y susceptibles (S), a imazapir aplicadas a razón de 320 g a.i. ha⁻¹.

La figura 7 muestra la secuencia de nucleótidos completa del gen *AHASL1* de la línea RW-B (SEC ID n.º: 1).

La figura 8 muestra la secuencia de aminoácidos completa del gen *AHASL1* de la línea RW-B (SEC ID n.º: 2).

La figura 9 muestra la reducción en altura (como porcentaje de las plantas de control no tratadas) para 4 líneas que portan alelos mutantes diferentes en el locus *AHASL1* de días del girasol 14 después de la aplicación de índices aumentados de imazapir.

La figura 10 muestra el índice de fitotoxicidad para 4 líneas de girasol que portan alelos mutantes diferentes en el locus *AHASL1* de girasol cuando se inoculan con índices aumentados de imazapir.

La figura 11 muestra curvas de respuesta a la dosis para biomasa de peso en seco sobre el suelo (como porcentaje de las plantas de control no tratadas) para 4 líneas de girasol que portan alelos mutantes diferentes en el locus *AHASL1* cuando es inoculada con índices aumentados de imazapir.

La figura 12 muestra el índice de fitotoxicidad para 4 líneas de girasol que portan alelos mutantes diferente en el locus *AHASL1* de girasol cuando son inoculadas con índices aumentados de metsulfurón.

La figura 13 muestra curvas de respuesta a la dosis se curva para biomasa de peso en seco sobre el suelo (como porcentaje de las plantas de control no tratadas) para 4 líneas de girasol que portan diferentes alelos mutantes en el locus *AHASL1* cuando se inoculan con índices aumentados de metsulfurón.

Descripción detallada

[0016] Se proporcionan plantas de girasol que tienen resistencia aumentada a los herbicidas con respecto a las plantas de girasol de tipo salvaje según la reivindicación 1. Estas plantas contienen una mutación genética nueva en el gen *AHAS* que confiere una resistencia de amplio espectro a los herbicidas inhibidores de *AHAS*, y esta mutación ha sido identificada y caracterizada. La disponibilidad de esta mutación nueva, junto con el uso de herbicidas inhibidores de *AHAS* disponibles, proporciona un sistema de producción de planta de cultivo de girasol tolerante a los herbicidas y representa una opción de control de hierbas nueva y potente para los productores de girasol.

[0017] Diferentes sustituciones de *AHAS* supondrán resistencia a los inhibidores de *AHAS*; la magnitud de la resistencia a diferentes herbicidas inhibidores de *AHAS*, sin embargo, varía mucho entre sustituciones (Saari *et al.*, 1994; Tranel and Wright, 2002). Aunque existen excepciones, la resistencia provocada por un *AHAS* alterado se puede clasificar generalmente en tres tipos basándose en la resistencia de cruce: (1) resistencia específica de SU, (2) resistencia específica de IMI y (3) resistencia cruzada amplia. Mutaciones puntuales que dan como resultado sustituciones de prolina (Pro)197 confieren altos niveles de resistencia a la sulfonilurea con solo pequeños aumentos en la resistencia a las imidazolinonas y las triazopirimidinas (Haughn *et al.*, 1988; Lee *et al.*, 1988; Guttieri *et al.*, 1992; Harms *et al.*, 1992; Mourad and King 1992; Guttieri *et al.*, 1995; Wright *et al.*, 1998). Las sustituciones de alanina (Ala)205, por otro lado, muestran una amplia resistencia cruzada, sin embargo, los niveles de resistencia son moderados (Saari *et al.*, 1994; Tranel and Wright, 2002). Las sustituciones de (Ala)122 dan como resultado resistencia a IMI pero no a Su (véase, por ejemplo, Sala *et al.*, 2008 a & b).

[0018] Las características y los genes de resistencia a herbicidas inhibidores de *AHAS* en girasol han recibido nombres diferentes. El alelo resistente a IMI fue designado como *Imr1* (Bruniard and Miller, 2001), *Ar_{pur}* o A205V (Kolkman *et al.* 2004) o *AHASL1-1* (véase, por ejemplo, Sala *et al.* 2008b) y la característica fue denominada IMISUN. El alelo resistente a SU fue designado como *Ar_{kan}* o P197L (Kolkman *et al.* 2004) o *AHASL1-2* (véase, por ejemplo, Sala *et al.*, 2008b) y la característica se conoce como SURES. El alelo altamente resistente a IMI presente en CLHA-Plus fue designado como *AHASL1-3* o A122T (véase, por ejemplo, Sala *et al.*, 2008b).

[0019] Los presentes inventores sorprendentemente descubrieron que una mutación nueva en el codón 574 (nomenclatura de *Arabidopsis thaliana*) del gen de girasol *AHASL1* confiere altos niveles, y resistencia de amplio espectro a al menos cuatro de las cinco familias de herbicidas inhibidores de *AHAS*. Esta mutación única, que cambia un triptófano en una leucina en la proteína de *AHAS*, es responsable de esta amplitud destacable de resistencia al herbicida donde los girasoles de la invención de forma imprevista tienen resistencia a todos los herbicidas IMI, SU, TP y POB. Por consiguiente, esta mutación nueva proporciona varias ventajas tecnológicas sobre todas las mutaciones resistentes actualmente conocidas en el girasol. Estas ventajas incluyen, pero de forma no limitativa, la capacidad para: aplicar nuevos tipos de herbicidas a plantas de cultivo de girasol que ordinariamente no se podrían aplicar sin que afectara negativamente al propio girasol; aplicar una mezcla de dos o más herbicidas al mismo tiempo a plantas de cultivo de girasol que de otro modo no serían combinables; variar el tiempo y tipo de aplicación herbicida al girasol; y aplicar más de una post emergencia herbicida debido a resistencia sobrante.

[0020] Se proporcionan métodos para combatir la vegetación no deseada o controlar los hierbajos tratando las semillas de girasol de las plantas resistentes con un herbicida inhibidor de *AHAS* o una mezcla de herbicidas antes de la siembra y/o después de la pregerminación. Las semillas tratadas son luego sembradas, por ejemplo, en el suelo en un campo o en un medio de encapsulamiento en el invernadero. Las plantas resultantes también se pueden tratar con un herbicida inhibidor de *AHAS* o una mezcla de herbicidas para combatir vegetación no deseada y/o para controlar hierbajos en la proximidad inmediata de las plantas de girasol.

[0021] Experimentos de retrocruce asistido por marcadores permitieron el desarrollo de plantas de girasol resistentes al herbicida múltiples comercialmente útiles descritas aquí. En el retrocruce, la selección directa se puede aplicar donde un locus genético actúa como una característica parcialmente dominante tal como con la característica de resistencia al

herbicida. Para seleccionar las plantas de girasol de las invenciones, los descendientes del cruce inicial fueron pulverizados con el herbicida antes del retrocruce. Las plantas eliminadas con la pulverización que no tuvieron la característica de resistencia al herbicida deseada, y las plantas que tenían el gen de resistencia herbicida se usaron en retrocruzamientos posteriores. Este proceso fue repetido para todas las generaciones de retrocruce adicionales, hasta que se obtuvieron las plantas que se producían de verdad para resistencia a múltiples herbicidas.

[0022] Además de resistencia al herbicida, las plantas de girasol también tienen otras muchas características ventajosas. Así, las semillas de girasol tienen una o más de las siguientes características, un contenido en aceite mayor del 40%, un rendimiento de semilla de más de una tonelada por hectárea y una planta de girasol que tiene una única cabeza. Sorprendentemente, estas características se encuentran en combinaciones entre sí y con la resistencia al herbicida de amplio espectro conferida por la mutación en el codón 574.

[0023] Debido a que las plantas de girasol descritas aquí son, notablemente, resistentes a cuatro o más familias de herbicidas, los agricultores pueden tratar las plantas de cultivo con una gama más amplia de herbicidas que lo que había previamente disponible para el uso con girasoles. Controlar hierbajos en las plantas de cultivo de girasol es necesario para evitar el crecimiento pobre y la pérdida de rendimiento, y la capacidad de usar más de un herbicida al mismo o en momentos diferentes durante la temporada de crecimiento proporciona ventajas de control de hierbajos significativas sobre las variedades de girasol convencionales. Por ejemplo, debido a que los girasoles que crecen a partir de semillas pueden tardar hasta dos semanas en aparecer, los hierbajos pueden muy fácilmente establecerse y luego hacer sombra a las semillas de girasol, lo que impedirá el crecimiento de los girasoles. Sin control, la competición de las hierbas en las plantas de cultivo de girasol lleva a mayores pérdidas económicas para los productores debido a reducciones del rendimiento que alcanzan hasta un 50%. Las plantas de la presente invención evitan estos problemas porque su resistencia a más de una familia de herbicida existente permite protocolos de aplicación de herbicidas mejorados.

[0024] Otra ventaja de resistencia al herbicida para familias múltiples de herbicidas es que los agricultores pueden comercialmente explotar plantas de cultivo de girasol sin los gastos adicionales del desarrollo de nuevos herbicidas. Herbicidas de cultivo de girasol nuevos no son fáciles de desarrollar debido al alto coste de registro del herbicida. Las resistencias múltiples a herbicidas conocidos es también ventajosa para las plantas de cultivo de girasol susceptibles de daños por arrastre. El arrastre se produce cuando los herbicidas de la planta de cultivo precedente afecta al crecimiento de la planta de cultivo actual. Tener resistencia a herbicidas múltiples reduce el daño provocado a las plantas de cultivo de girasol debido al arrastre. Además, la capacidad aumentada para controlar los hierbajos en las plantas de girasol de la invención significa que problemas de hierbajos futuros en las plantas de cultivo cultivadas después de los girasoles también están limitadas.

[0025] En el contexto de la presente invención, los términos “tolerante a los herbicidas” y “resistente a los herbicidas” se usan de forma intercambiable y tienen un significado equivalente y un alcance equivalente. De forma similar, los términos “tolerancia a los herbicidas” y “resistencia a los herbicidas” se usan de forma intercambiable y tienen un significado equivalente y un alcance equivalente. Asimismo, los términos para las familias de herbicidas, por ejemplo “resistente a la imidazolinona” y “resistencia a la imidazolinona”, se usan de forma intercambiable y tienen significados equivalentes y ámbitos como los términos “tolerante a la imidazolinona” y “tolerancia a la imidazolinona”, respectivamente.

[0026] Polinucleótidos AHASL resistentes a los herbicidas y proteínas AHASL resistentes a los herbicidas se proporcionan. El término “polinucleótido AHASL resistente a los herbicidas” se refiere, para fines de esta invención, a un polinucleótido que codifica una proteína que comprende actividad de AHAS resistente a los herbicidas. Un “proteína AHASL tolerante a los herbicidas” o “proteína AHASL resistente a los herbicidas,” es una proteína AHASL que muestra actividad de AHAS hasta cierto grado más alta, con respecto a la actividad de AHAS de una proteína AHASL de tipo salvaje, cuando está en presencia de al menos un herbicida que es conocido por interferir con la actividad de AHAS y en una concentración o nivel del herbicida que es conocido por inhibir la actividad de AHAS de la proteína AHASL de tipo salvaje. Una planta “tolerante a los herbicidas” o “resistente a los herbicidas” es una planta que es tolerante o resistente a al menos un herbicida, aplicado en una cantidad específica, que normalmente mataría o inhibiría el crecimiento de una planta normal o de tipo salvaje. En una forma de realización, las plantas tolerantes a los herbicidas de la presente invención comprenden una proteína AHASL tolerante a los herbicidas o resistente a los herbicidas. Aunque publicaciones recientes sugieren designaciones de nomenclatura diferentes, aquí y en todas partes, el término AHASL se usará para representar la subunidad catalítica o grande (L) de la enzima AHAS. Véase, por ejemplo, Duggleby *et al.*, 2008 Plant Physiol. Biochem. 46: 309-324.

[0027] Además, una proteína AHASL tolerante a los herbicidas o resistente a los herbicidas se puede introducir en una planta de girasol por transformación de una planta o ancestro de la misma con una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína AHASL tolerante a los herbicidas o resistente a los herbicidas. Tales proteínas AHASL tolerantes a los herbicidas o resistentes a los herbicidas son codificadas por los polinucleótidos AHASL tolerantes a los herbicidas o resistentes a los herbicidas. Alternativamente, una proteína AHASL tolerante a los herbicidas o resistente a los herbicidas puede producirse en una planta de girasol como resultado de una mutación de origen natural o inducida en un gen AHASL endógeno en el genoma de una planta o progenitor de la misma. La presente invención proporciona plantas de girasol, tejidos de planta, células vegetales y células huésped con resistencia o tolerancia aumentada a uno o

varios herbicidas, incluyendo, pero no limitado a, un herbicida IMI, un herbicida SU, un herbicida TP, un herbicida POB. Ventajosamente, la plantas tienen resistencia o tolerancia aumentada a dos o más de los herbicidas anteriores y, más ventajosamente, resistencia o tolerancia aumentada a tres o más de los herbicidas anteriores. De forma más ventajosa, la plantas tienen resistencia o tolerancia aumentada a cuatro o más de los herbicidas anteriores.

[0028] La cantidad o concentración preferida del herbicida que se aplica a las plantas o las semillas como se describe en este caso es una “cantidad eficaz” o “concentración eficaz”. Los términos “cantidad eficaz” y “concentración eficaz” se refieren, para fines de esta invención, a una cantidad y concentración, respectivamente, que es suficiente para matar o inhibir el crecimiento de una planta, tejido vegetal, célula vegetal o célula huésped similar de tipo salvaje, pero que dicha cantidad no mata o inhibe tan seriamente el crecimiento de las plantas resistentes al herbicida, tejidos de planta, células vegetales y células huésped de la presente invención. Típicamente, una cantidad eficaz de un herbicida es una cantidad que se usa de forma rutinaria en sistemas de producción agrícolas para matar hierbajos de interés. Tal cantidad se conoce por las personas expertas en la materia. Una planta, tejido vegetal, célula vegetal o célula huésped de tipo salvaje,” es una planta, tejido vegetal, célula vegetal o célula huésped, respectivamente, que carece de características de resistencia a los herbicidas y/o polinucleótido particular de la invención. El término “tipo salvaje” no implica que una planta, tejido vegetal, célula vegetal u otra célula huésped carezca de ADN recombinante en su genoma, y/o no posea características resistentes a los herbicidas que sean diferentes a los aquí descritos. El término “planta” se refiere a una planta en cualquier fase de desarrollo, al igual que cualquier parte o partes de una planta que se pueda unir o separar de una planta intacta entera. Tales partes de una planta incluyen, pero de forma no limitativa, órganos, tejidos y células de una planta. Ejemplos de partes de planta particular incluyen un vástago, una hoja, una raíz, una florescencia, una flor, un flósculo, una fruta, un pedículo, un pedúnculo, un estambre, un antera, un estigma, un estilo, un ovario, un pétalo, un sépalo, un carpelo, una punta de raíz, una cofia radicular, un pelo de raíz, un pelo de hoja, un pelo de semilla, un grano de polen, una microespora, un cotiledón, un hipocotilo, un epicotilo, xilema, floema, parénquima, endospermo, una célula acompañante, una célula guarda y cualquiera de los demás órganos, tejidos y células de una planta conocidos. Además, se reconoce que una semilla es una planta.

[0029] La presente invención describe una planta de girasol que tiene resistencia aumentada a un herbicida IMI, un herbicida SU, un herbicida TP, un herbicida POB, y/o mezclas derivadas en comparación con una variedad de tipo salvaje de la planta. Se proporciona aquí una descripción detallada del cultivo y selección de plantas de girasol que tienen tal resistencia aumentada a un herbicida IMI, un herbicida SU, un herbicida TP, un herbicida POB, y/o mezclas derivadas. Una planta derivada de estos procedimientos se deposita en el ATCC (*Patent Deposit Designation Number* PTA-9176) y se designa aquí como la variedad de girasol RW-B. Un depósito de 2.500 semillas de la variedad de girasol RW-B se hizo en la *American Type Culture Collection* el 25 de abril de 2008. Este depósito se hizo conforme a los términos y provisiones del Tratado de Budapest sobre el depósito de microorganismos. El depósito se hizo por un periodo de al menos treinta años y al menos cinco años después de que se haya producido una solicitud más reciente de suministro de una muestra del depósito recibida por el ATCC.

[0030] Las plantas de girasol de la presente invención incluyen tanto plantas no transgénicas como plantas transgénicas. Un “planta no transgénica” es una planta que carece de ADN recombinante en su genoma. Un “planta transgénica” es una planta que comprende ADN recombinante en su genoma y se pueden producir por introducción de ADN recombinante en el genoma de la planta. Cuando tal ADN recombinante se incorpora al genoma de la planta transgénica, la progenie de la planta puede también comprender el ADN recombinante. Una planta progenie que comprende al menos una parte del ADN recombinante de al menos una planta transgénica madre es también una planta transgénica. Un ejemplo de una planta de girasol no transgénica que tiene resistencia aumentada a un herbicida IMI, un herbicida SU, un herbicida TP, un herbicida POB y/o mezclas derivadas es la planta de girasol RW-B o un derivado genéticamente modificado de la planta de girasol RW-B, o de cualquier descendiente de la planta de girasol RW-B, o una planta que comprende las características de tolerancia al herbicida de la planta de girasol RW-B.

[0031] Las plantas de girasol se pueden propagar a través de técnicas de cultivo de tejido y celular. Esencialmente, cualquier tejido vegetal con células capaces de división celular se puede usar para la propagación de la planta a través de técnicas de cultivo de tejido y celular. Los cultivos se pueden comenzar a partir de una hoja, polen, un embrión, un cotiledón, un hipocotilo, células meristemáticas, una raíz, una punta de raíz, un antera, una flor, una semilla, un vástago, óvulos, brotes, tallos, varillas, cápsula de mesocarpio o una vaina. Los tejidos tomados del área vascular de tallos y raíces son especialmente adecuados. Las patentes de EE.UU. n.º: 4.670.391, 4.670.392, 4.673.648, 4.681.849, 4.687.743 y 5.030.572 describen métodos para regenerar plantas de girasol a partir de cultivos celulares derivados de tejidos de girasol. El estado de la técnica es tal que métodos ejemplares de obtención de plantas de girasol a partir de cultivos de células y cultivos de tejidos son ahora bien conocidos por un experto en la materia. Una variedad de técnicas de cultivo de plantas se puede utilizar para regenerar plantas enteras, tal y como se describe en Gamborg and Phillips, “Plant Cell, Tissue and Organ Culture, Fundamental Methods”, Springer Berlin, Evans *et al.* “Protoplasts Isolation and Culture”, Handbook of Plant Cell Culture, Macmillan Publishing Company, New York, 1983; o Binding, “Regeneration of Plants, Plant Protoplasts”, CRC Press, Boca Raton, 1985; o en Klee *et al.*, Ann. Rev. of Plant Phys. 38:467 (1987). Descripciones detalladas de sistemas de cultivo para *Helianthus annuus* se pueden encontrar en Capítulo 11, Sunflower Biotechnology, Bidney, D. L. and Scelonge, C. J., páginas 559-593 y referencias citadas en él, Sunflower Technology and Production, editado por A. A. Schneiter, Agronomy 35, editores, American Society of Agronomy Inc. 1997, Transformation of Sunflower.

[0032] Plantas de girasol resistentes a los herbicidas se pueden producir usando métodos de cultivo de tejido para seleccionar células vegetales que comprendan mutaciones de resistencia a los herbicidas y luego regenerar plantas resistentes a los herbicidas a partir de ellas. Véase, por ejemplo, las patentes de EE.UU. n.º: 5.773.702 y 5.859.348. Detalles adicionales de cultivo con mutación se pueden encontrar en "Principals of Cultivar Development" Fehr, 1993 Macmillan Publishing Company.

Un gen mutante y su proteína codificada confieren amplia resistencia al herbicida en plantas de girasol

[0033] Los presentes inventores han descubierto que la substitución por el triptófano en la posición del aminoácido 574, o una posición equivalente (nomenclatura de *Arabidopsis thaliana*), en una proteína AHASL puede hacer que una planta de girasol exprese esa proteína que ha mejorado resistencia a un herbicida, particularmente un herbicida IMI, un herbicida SU, un herbicida TP, un herbicida POB y/o mezclas derivadas. Más específicamente, esta proteína mutante confiere resistencia a herbicidas múltiples en las plantas.

[0034] Por consiguiente, las plantas de girasol resistentes a los herbicidas descritas aquí incluyen, pero de forma no limitativa, plantas de girasol que tienen en sus genomas al menos una copia de un polinucleótido AHASL que codifica una proteína AHASL resistente a los herbicidas que tiene una sustitución de leucina en la posición del aminoácido 574 (nomenclatura de *Arabidopsis thaliana*). Además, los expertos en la materia reconocerán que tales posiciones de aminoácidos pueden variar dependiendo de si los aminoácidos son agregados o retirados de, por ejemplo, el extremo N-terminal de una secuencia de aminoácidos. Así, formas de realización de la presente invención abarcadas aquí incluyen sustituciones de aminoácidos en la posición nombrada o posición equivalente (por ejemplo, "posición del aminoácido 574 o posición equivalente").

[0035] Una única sustitución de aminoácido que puede utilizarse para producir proteínas AHASL de girasol resistentes a los herbicidas se proporciona junto con los polinucleótidos que codifican tales proteínas, y plantas resistentes a los herbicidas, tejidos de planta, células vegetales y semillas que portan esta mutación. También se proporcionan polinucleótidos AHASL1, AHASL2 Y AHASL3 de girasol aislados que codifican proteínas AHASL1, AHASL2 Y AHASL3 resistentes a los herbicidas, respectivamente. Tales proteínas AHASL1 AHASL2 y AHASL3 resistentes a los herbicidas comprenden cada una un aminoácido diferente del triptófano en la posición 574 o posición equivalente (nomenclatura de *Arabidopsis thaliana*). Preferiblemente, en tales proteínas AHASL1, AHASL2 y AHASL3 resistentes a los herbicidas, el aminoácido en la posición 574 o posición equivalente es leucina.

[0036] Además, se proporcionan polipéptidos aislados que codifican proteínas AHASL. Los polipéptidos aislados codifican una secuencia de aminoácidos que tiene las secuencias de aminoácidos expuestas en la FIG. 8 (secuencia de aminoácidos del gen AHASL1 de la línea RW-B, SEC ID n.º: 2), las secuencias de aminoácidos codificadas por secuencias de nucleótidos expuestas en la FIG. 7 (secuencia de nucleótidos del gen AHASL1 de la línea RW-B, SEC ID n.º: 1), y fragmentos funcionales y variantes de dichas secuencias de aminoácidos que codifican un polipéptido AHASL que comprende actividad de AHAS.

[0037] Las deleciones, inserciones y sustituciones de las secuencias proteínicas abarcadas aquí no se espera que produzcan cambios radicales en las características de la proteína. Sin embargo, cuando es difícil predecir el efecto exacto de la sustitución, deleción o inserción antes de hacerla, un experto en la técnica apreciará que el efecto será evaluado por ensayos de selección rutinarios. Esto es, la actividad se puede evaluar por ensayos de actividad de AHAS. Véase, por ejemplo, Singh *et al.* (1988) Anal. Biochem. 171: 173-179. Adicionalmente, las proteínas descritas aquí abarcan tanto proteínas de origen natural como variaciones y formas modificadas de las mismas. Tales variantes seguirán poseyendo la actividad de AHAS deseada.

[0038] La invención también proporciona polinucleótidos y proteínas aislados o purificados. Una molécula de polinucleótido o proteína "aislada" o "purificada", o parte biológicamente activa de la misma, está sustancialmente o esencialmente libre de componentes que normalmente acompañan o interactúan con la molécula de polinucleótido o proteína como se encuentra en su ambiente de origen natural. Así, una molécula de polinucleótidos o proteína aislada o purificada está sustancialmente libre de otro material celular, o medio de cultivo cuando se produce por técnicas recombinantes, o sustancialmente libre de precursores químicos u otros productos químicos cuando se sintetizan químicamente. Preferiblemente, un ácido nucleico "aislado" está libre de secuencias (preferiblemente secuencias codificantes de proteína) que naturalmente flanquean el ácido nucleico (es decir, secuencias localizadas en las extremidades 5' y 3' del ácido nucleico) en el ADN genómico del organismo del que se deriva el ácido nucleico. Por ejemplo, en varias formas de realización, la molécula de polinucleótido aislado puede contener menos de aproximadamente 5 kb, 4 Kb, 3 Kb, 2 Kb, 1 Kb, 0,5 Kb, 0,4 Kb, 0,3 Kb, 0,2 Kb o 0,1 kb de secuencias de nucleótidos que naturalmente flanquean la molécula de polinucleótido en el ADN genómico de la célula de la que se deriva el ácido nucleico. Una proteína que está sustancialmente libre de material celular incluye preparaciones de proteína que tienen menos de aproximadamente 30%, 25%, 20%, 15%, 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2% o 1% (por peso en seco) de proteína contaminante. Cuando la proteína de la presente invención o parte biológicamente activa de la misma se produce de forma recombinante, preferiblemente el medio de cultivo representa menos de aproximadamente 30%, 25%, 20%, 15%, 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2% o 1% (por peso en seco) de precursores químicos o productos químicos de interés no proteicos.

[0039] Se proporcionan moléculas de polinucleótidos aislados que tienen secuencias de nucleótidos que codifican proteínas AHASL y las proteínas correspondientes. También se proporcionan secuencias de nucleótidos que codifican una proteína AHASL resistente a los herbicidas a partir de una planta de girasol resistente a los herbicidas. En una forma de realización, las proteínas AHASL de girasol resistentes a los herbicidas tienen una sustitución triptófano-a-leucina en la posición del aminoácido 574 o posición equivalente (nomenclatura de *Arabidopsis thaliana*) cuando se compara con la secuencia de aminoácidos de tipo salvaje correspondiente. En particular, se proporcionan moléculas de polinucleótidos aislados que comprenden secuencias de nucleótidos que codifican las secuencias de aminoácidos mostradas en la FIG. 8 y fragmentos y variantes de las mismas que codifican polipéptidos que comprenden actividad de AHAS. Además, se proporcionan polipéptidos que tienen una secuencia de aminoácidos codificada por una molécula de polinucleótido descrita aquí, por ejemplo las expuestas en la FIG. 7, y fragmentos y variantes de las mismas que codifican polipéptidos que comprenden actividad de AHAS.

[0040] Además, el experto en la materia apreciará también qué cambios se pueden introducir por mutación en las secuencias de nucleótidos de la invención llevando así a cambios en la secuencia de aminoácidos de las proteínas AHASL codificadas sin alterar la actividad biológica de las proteínas AHASL. Así, una molécula de polinucleótido aislado que codifica una proteína AHASL que tiene una secuencia que difiere de la de SEC ID n.º: 2, se puede crear por introducción de una o más sustituciones, adiciones o deleciones de nucleótidos en la secuencia de nucleótidos correspondiente descrita aquí, de manera que una o más sustituciones, adiciones o deleciones de aminoácidos se introduzcan en la proteína codificada. Se pueden introducir mutaciones por técnicas estándar, tales como mutagénesis dirigida al sitio y mutagénesis mediada por PCR.

[0041] Las moléculas de polinucleótidos AHASL resistentes a los herbicidas aislados de la invención se pueden usar en constructos polinucleótidos para la transformación de plantas, particularmente plantas de cultivo, para mejorar la resistencia de las plantas a los herbicidas, particularmente herbicidas que son conocidos por inhibir la actividad de AHAS, más particularmente un herbicida IMI, un herbicida SU, un herbicida TP, herbicida POB y/o mezclas derivadas. Tales constructos polinucleótidos se pueden usar en los casetes de expresión, vectores de expresión, vectores de transformación, plásmidos y similares. Las plantas transgénicas obtenidas tras la transformación con tales constructos polinucleótidos muestran resistencia aumentada para herbicidas inhibidores de AHAS tales como, por ejemplo, un herbicida IMI, un herbicida SU, un herbicida TP, un herbicida POB y/o mezclas derivadas.

[0042] Las moléculas de polinucleótidos aislados que tienen una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína AHASL mutante como se ha descrito anteriormente se pueden usar en vectores para transformar plantas de modo que las plantas creadas tengan resistencia a los herbicidas mejorada, particularmente a un herbicida IMI, un herbicida SU, un herbicida TP, un herbicida POB y/o mezclas derivadas. Las moléculas de polinucleótidos AHASL aislados de la presente invención se pueden usar en vectores solos o en combinación con una secuencia de nucleótidos que codifica la subunidad pequeña de la enzima AHAS (AHASS) confiriendo la resistencia al herbicida en plantas. Véase la patente de EE.UU. n.º 6.348.643.

[0043] Moléculas de polinucleótidos que difieren de las secuencias de nucleótidos descritas aquí están también abarcadas por la presente invención. Las secuencias de nucleótidos de la presente invención incluyen aquellas secuencias que codifican las proteínas AHASL descritas aquí pero que difieren de forma conservadora debido a la degeneración del código genético. Estas variantes alélicas de origen natural se pueden identificar con el uso de técnicas de biología molecular bien conocidas, tal como reacción en cadena de polimerasa (PCR) y técnicas de hibridación como se esboza por debajo. Las secuencias de nucleótidos también incluyen secuencias de nucleótidos sintéticamente derivadas que han sido generadas, por ejemplo, usando mutagénesis dirigida al sitio pero que aún codifican la proteína AHASL. Generalmente, variantes de la secuencia de nucleótidos de la presente invención tendrán al menos aproximadamente 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad de secuencia con una secuencia de nucleótidos particular descrita aquí. La secuencia de nucleótidos AHASL codificará una proteína AHASL, respectivamente, que tiene una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de una proteína AHASL descrita aquí.

[0044] Formas de realización de la invención también se refieren a un vector de expresión de planta que tiene un promotor que dirige la expresión en una planta operativamente enlazada a una molécula de polinucleótido aislado de la presente invención. La molécula de polinucleótido aislado comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína AHASL, o un fragmento funcional y variante de la misma. Los vectores de expresión de planta de las formas de realización de la presente invención no dependen de un promotor particular, solo que tal promotor es capaz de dirigir la expresión génica en una célula vegetal. Promotores preferidos incluyen promotores constitutivos y promotores preferidos del tejido.

[0045] Los vectores de transformación pueden utilizarse para producir plantas transformadas con un gen de interés. El vector de transformación tendrá gen marcador seleccionable de la presente invención y un gen de interés que se va a introducir y típicamente expresado en la planta transformada. Tal gen marcador seleccionable tiene un polinucleótido AHASL resistente al herbicida de la presente invención operativamente enlazado a un promotor que dirige la expresión en una célula huésped. Para su uso en plantas y células vegetales, el vector de transformación tiene un gen marcador seleccionable que comprende un polinucleótido AHASL resistente a los herbicidas de la presente invención

operativamente enlazado a un promotor que dirige la expresión en una célula vegetal. Los genes de interés de la presente invención varían dependiendo de los resultados deseados. Por ejemplo, varios cambios en el fenotipo pueden ser de interés, incluyendo la modificación de la composición del ácido graso en una planta, alteración del contenido de aminoácido de una planta, alteración de un insecto de planta y/o mecanismos de defensa patógena y similares. Estos resultados se pueden conseguir proporcionando expresión de productos heterólogos o expresión aumentada de productos endógenos en las plantas. Alternativamente, los resultados se pueden conseguir proporcionando una reducción de la expresión de uno o más productos endógenos, particularmente enzimas o cofactores en la planta. Estos cambios suponen un cambio en el fenotipo de la planta transformada.

[0046] En una forma de realización, los genes de interés incluyen genes de resistencia a los insectos tales como, por ejemplo, genes de proteína de toxina de *Bacillus thuringiensis* (Patente de EE.UU. n.: 5.366.892, 5.747.450, 5.736.514, 5.723.756, 5.593.881; y Geiser *et al.* (1986) Gene 48: 109). Las proteínas o polipéptidos AHASL descritos aquí se pueden purificar a partir de, por ejemplo, plantas de girasol. También, una molécula de polinucleótido aislado que codifica una proteína AHASL de la presente invención puede utilizarse para expresar una proteína AHASL de la presente invención en un microbio tal como *E. coli* o una levadura. La proteína AHASL expresada se puede purificar a partir de extractos de *E. coli* o levadura por cualquier método conocido por los expertos en la materia.

[0047] Las formas de realización de la presente invención abarcan moléculas de polinucleótidos AHASL y fragmentos y variantes de las mismas. Para fines de esta invención, el término "fragmentos y variantes" se refiera a fragmentos y variantes de los polipéptidos ejemplificados que comprenden actividad de AHAS. En formas de realización determinadas, los métodos implican el uso de plantas tolerantes a los herbicidas o resistentes a los herbicidas. Un fragmento de una secuencia de nucleótidos AHASL de la presente invención puede codificar una parte biológicamente activa de una proteína AHASL, o puede ser un fragmento que se puede usar como una sonda de hibridación o cebador PCR usando métodos descritos más abajo. Una parte biológicamente activa de una proteína AHASL se puede preparar por aislamiento de una parte de una de las secuencias de nucleótidos AHASL de la presente invención, expresando la parte codificada de la proteína AHASL (por ejemplo, por expresión recombinante *in vitro*) y evaluando la actividad de la parte codificada de la proteína AHASL1. Moléculas de polinucleótidos que son fragmentos de una secuencia de nucleótidos AHASL comprenden al menos aproximadamente 15, 20, 25, 30, 40, 50, 75, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700, 750, 800, 850, 900, 950, 1000, 1050 o 1100 nucleótidos, o hasta el número de nucleótidos presentes en una secuencia de nucleótidos en toda su longitud descrita aquí dependiendo del uso destinado.

[0048] Un fragmento de una secuencia de nucleótidos AHASL que codifica una parte biológicamente activa de una proteína AHASL de la presente invención codificará al menos aproximadamente 15, 20, 25, 30, 40, 50, 75, 100, 125, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 325 o 350 aminoácidos contiguos, o hasta el número total de aminoácidos presente en una proteína AHASL en toda su longitud de la presente invención. Fragmentos de una secuencia de nucleótidos AHASL que son útiles como sondas de hibridación para cebadores de PCR necesitan no codificar una parte biológicamente activa de una proteína AHASL.

[0049] Secuencias de nucleótidos AHASL variantes se pueden hacer por introducción de mutaciones de forma aleatoria a lo largo de toda o parte de una secuencia codificante AHASL, tal como por mutagénesis de saturación, y los mutantes resultantes se pueden seleccionar para actividad de AHAS para identificar mutantes que retengan actividad de AHAS, incluyendo actividad de AHAS resistente a los herbicidas. Tras la mutagénesis, la proteína codificada se puede expresar de forma recombinante, y la actividad de la proteína se puede determinar utilizando técnicas de ensayo estándar. Así, las secuencias de nucleótidos de la invención incluyen las secuencias descritas aquí al igual que fragmentos y variantes de las mismas. Las secuencias de nucleótidos AHASL de la presente invención, y fragmentos y variantes de las mismas, se pueden usar como sondas y/o cebadores para identificar y/o clonar homologías AHASL en otras plantas, tales sondas pueden utilizarse para detectar transcritos o secuencias genómicas que codifican las mismas proteínas o proteínas idénticas. De esta manera, métodos tales como PCR, hibridación y similares puede utilizarse para identificar tales secuencias que tienen identidad sustancial con las secuencias de la presente invención. Véase, por ejemplo, Sambrook *et al.* (1989) Molecular Cloning: Laboratory Manual (2ª ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, NY) y Innis, *et al.* (1990) PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications (Academic Press, NY). Secuencias de nucleótidos AHASL aisladas basadas en su identidad de secuencia con las secuencias de nucleótidos AHASL expuestas aquí o con fragmentos y variantes de las mismas están abarcados por la presente invención.

Transgénesis

[0050] Se describen aquí métodos para crear una planta transgénica que sea resistente a los herbicidas. Los métodos incluyen la transformación de una planta con un vector de expresión de planta que tiene un promotor que dirige la expresión en una planta que está operativamente enlazada con una molécula de polinucleótido aislado de la invención. La molécula de polinucleótido aislado tiene una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína AHASL o un fragmento funcional y variante de las secuencias de aminoácidos.

[0051] Las formas de realización de la presente invención proporcionan plantas, órganos vegetales, tejidos vegetales, células vegetales, semillas y células huésped no humanas que se transforman con al menos una molécula de polinucleótido, casete de expresión o vector de transformación de la invención. Tales plantas transformadas, órganos

vegetales, tejidos vegetales, células vegetales, semillas y células huésped no humanas tienen tolerancia o resistencia mejorada a al menos un herbicida, a niveles del herbicida que mata o inhibe el crecimiento de una planta no transformada, tejido vegetal, célula vegetal o célula huésped no humana, respectivamente.

[0052] Los polinucleótidos AHASL descritos aquí se usan en métodos para mejorar la resistencia de plantas tolerantes a los herbicidas. En una forma de realización, las plantas tolerantes a los herbicidas tienen una proteína AHASL tolerante a los herbicidas o resistente a los herbicidas. Las plantas tolerantes a los herbicidas incluyen tanto plantas transformadas con una secuencia de nucleótidos AHASL tolerante a los herbicidas como plantas que tienen en sus genomas un gen endógeno que codifica una proteína AHASL tolerante a los herbicidas. Secuencias de nucleótidos que codifican proteínas AHASL tolerantes a los herbicidas y plantas tolerantes a los herbicidas que tienen un gen endógeno que codifica una proteína AHASL tolerante a los herbicidas incluyen los polinucleótidos y las plantas descritas aquí y las que se conocen en la técnica. Véase, por ejemplo, las patentes de EE.UU. n.º.: 5,013,659, 5,731,180, 5,767,361, 5,545,822, 5,736,629, 5,773,703, 5,773,704, 5,952,553 y 6,274,796. Tales métodos para mejorar la resistencia de plantas tolerantes a los herbicidas comprenden la transformación de una planta tolerante a los herbicidas con al menos una construcción de polinucleótidos que tiene un promotor que dirige la expresión en una célula vegetal que está operativamente enlazada a un polinucleótido AHASL resistente a los herbicidas de la invención, particularmente el polinucleótido codifica una proteína AHASL resistente a los herbicidas y fragmentos y variantes dichos de polinucleótidos que codifican polipéptidos que comprenden actividad de AHAS resistente a los herbicidas. Ninguna de las proteínas AHASL antes de la presente invención fueron capaces, sin embargo, de conferir el amplio espectro y la potente resistencia al herbicida obtenidos utilizando el gen AHASL de la presente invención.

[0053] Numerosos vectores de transformación de planta y métodos para transformar plantas están disponibles. Véase, por ejemplo, An, G. *et al.* (1986) *Plant Physiol.* 81:301-305; Fry, J., *et al.* (1987) *Plant Cell Rep.* 6:321-325; Block, M. (1988) *Theor. Appl. Genet.* 76:767-77; Hinchey, *et al.* (1990) *Stadler. Genet. Symp.* 203/212.203-212; Cousins *et al.* (1991) *Aust. J. Plant Physiol.* 18:481-494; Chee, P. P. y Slightom, J. L. (1992) *Gene* 118:255-260; Christou, *et al.* (1992) *Trends. Biotechnol.* 10:239-246; D'Halluin, *et al.* (1992) *Bio/Technol.* 10:309-314; Dhir, *et al.* (1992) *Plant Physiol.* 99:81-88; Casas *et al.* (1993) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 90:11212-11216; Christou, P. (1993) *In Vitro Cell. Dev. Biol.- Plant*; 29P:119-124; Davies, *et al.* (1993) *Plant Cell Rep.* 12:180-183; Dong, J. A. and Mchughen, A. (1993) *Plant Sci.* 91: 139-148; Franklin, C. I. y Trieu, T. N. (1993) *Plant Physiol.* 102:167; Golovkin, *et al.* (1993) *Plant Sci.* 90:41-52; Guo Chin Sci Bull. 38:2072-2078; Asano, *et al.* (1994) *Plant Cell Rep.* 13; Ayeres N. M. and Park, W. D. (1994) *Crit. Rev. Plant. Sci.* 13:219-239; Barcelo, *et al.* (1994) *Plant. J.* 5:583-592; Becker, *et al.* (1994) *Plant. J.* 5:299-307; Borkowska *et al.* (1994) *Acta. Physiol. Plant* 16:225-230; Christou, P. (1994) *Agro. Food. Md Hi Tech.* 5: 17-27; Eapen *et al.* (1994) *Plant Cell Rep.* 13:582-586; Hartman, *et al.* (1994) *Bio-Technology* 12: 919923; Ritala, *et al.* (1994) *Plant. Mol. Biol.* 24:317-325; y Wan, Y. C. and Lemaux, P. G. (1994) *Plant Physiol.* 104:3748.

[0054] Formas de realización de los métodos de la invención incluyen la introducción de una construcción de polinucleótido en una planta. El término "introducción" se refiere a la presentación a la planta del constructo polinucleótido de manera que el constructo tenga acceso al interior de una célula de la planta. Los métodos no dependen de un método particular para la introducción de un constructo de polinucleótido en una planta, solo que el constructo de polinucleótido tiene acceso al interior de al menos una célula de la planta. Métodos para introducir constructos de polinucleótidos en plantas se conocen en la técnica incluyendo, pero no limitado a, métodos de transformación estable, métodos de transformación transitoria y métodos mediados por virus. El término "transformación estable" se refiere a que el constructo de polinucleótidos introducido en una planta se integra en el genoma de la planta y es capaz de ser heredado por la progenie de la misma. El término "transformación transitoria" significa que un constructo de polinucleótidos introducido en una planta no se integra en el genoma de la planta.

[0055] Para la transformación de plantas y células vegetales, las secuencias de nucleótidos de la invención son insertadas usando técnicas estándar en cualquier vector conocido en la técnica que sea adecuado para la expresión de las secuencias de nucleótidos en una planta o célula vegetal. La selección del vector depende de la técnica de transformación preferida y las especies vegetales objetivo que se quieren transformar. En una forma de realización de la presente invención, una secuencia de nucleótidos AHASL está operativamente enlazada a un promotor vegetal que se conoce por la expresión de alto nivel en una célula vegetal, y este constructo se introduce luego en una planta que es susceptible a uno o más de los siguientes herbicidas, un herbicida IMI, un herbicida SU, un herbicida TP o un herbicida POB, y una planta transformada es regenerada. La planta transformada es tolerante a la exposición a un nivel de un herbicida IMI, un herbicida SU, un herbicida TP, un herbicida POB y/o mezclas derivadas que matarían o dañarían significativamente una planta no transformada. Este método se puede aplicar a cualquier especie vegetal, sin embargo, es preferiblemente beneficioso cuando se aplica a plantas de girasol.

[0056] Metodologías para construir casetes de expresión de planta e introducir ácidos nucleicos foráneos en plantas se conocen generalmente en la técnica y se han descrito previamente. Por ejemplo, el ADN foráneo se puede introducir en plantas, usando vectores plásmidos de inducción tumoral (Ti). Otros métodos utilizados para la entrega de ADN foráneo implican el uso de transformación de protoplastos mediada por PEG, electroporación, filamentos de microinyección y bombardeo biolístico o de micro proyectil para dirigir la asimilación de ADN. Tales métodos se conocen en la técnica. (Patente de EE.UU. n.º.: 5,405,765 para Vasil *et al.*; Bilang *et al.* (1991) *Gene* 100: 247-250; Scheid *et al.* (1991) *Mol. Gen. Genet.* 228: 104-112; Gnerche *et al.* (1987) *Plant Science* 52: 111-116; Neuhauser *et al.* (1987) *Theor. Appl. Genet.* 75: 30-36; Klein *et al.* (1987) *Nature* 327: 70-73; Howell *et al.* (1980) *Science* 208:1265; Horsch *et al.* (1985) *Science*

227: 1229-1231; DeBlock *et al.* (1989) *Plant Physiology* 91: 694-701; *Methods for Plant Molecular Biology* (Weissbach and Weissbach, eds.) Academic Press, Inc. (1988) and *Methods in Plant Molecular Biology* (Schuler and Zielinski, Eds.) Academic Press, Inc. (1989). El método de transformación depende de la célula vegetal que va a ser transformada, estabilidad de los vectores usados, el nivel de expresión de los productos genéticos y otros parámetros.

[0057] Otros métodos adecuados de introducción de secuencias de nucleótidos en células vegetales y posterior inserción en el genoma vegetal incluyen microinyección como en Crossway *et al.* (1986) *Biotechniques* 4:320-334, electroporación como se describe en Riggs *et al.* (1986) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83:5602-5606, transformación mediada por *Agrobacterium* como se describe en Townsend *et al.*, Patente de EE.UU. n.º: 5,563,055, Zhao *et al.*, Patente de EE.UU. n.º: 5,981,840, transferencia de gen directa como se describe en Paszkowski *et al.* (1984) *EMBO J.* 3:2717-2722, y aceleración de partícula balística como se describe en, por ejemplo, Sanford *et al.*, Patente de EE.UU. n.º: 4,945,050; Tomes *et al.*, Patente de EE.UU. n.º:; Tomes *et al.*, Patente de EE.UU. n.º: 5,886,244; Bidney *et al.*, Patente de EE.UU. n.º: 5,932,782; Tomes *et al.* (1995) "Direct DNA Transfer into Intact Plant Cells via Micro projectile Bombardment," in *Plant Cell, Tissue, and Organ Culture: Fundamental Methods*, ed. Gamborg and Phillips (Springer-Verlag, McCabe *et al.* (1988) *Biotechnology* 6:923-926); and Lecl transformation (WO 00/28058) Véase también; De Wet *et al.* (1985) en *The Experimental Manipulation of Ovule Tissues*, ed. Chapman *et al.* (Longman, New York), páginas 197-209 (pollen); Kaeppler *et al.* (1990) *Plant Cell Reports* 9:415-418 and Kaeppler *et al.* (1992) *Theor. Appl. Genet.* 84:560-566 (whisker-mediated transformation); D'Halluin *et al.* (1992) *Plant Cell* 4: 1495-1505 (electroporation); Li *et al.* (1993) *Plant Cell Reports* 12:250-255.

[0058] Los polinucleótidos de las formas de realización de la presente invención se pueden introducir en plantas poniendo en contacto la planta con un virus o ácidos nucleicos virales. Generalmente, tales métodos implican la incorporación de un constructo de polinucleótido de la presente invención dentro de un ADN vírico o molécula de ARN. Se reconoce que la proteína AHASL de la presente invención puede ser inicialmente sintetizada como parte de una poliproteína vírica, que más tarde se puede procesar por proteólisis in vivo o in vitro para producir la proteína recombinante deseada. Además, se reconoce que los promotores de la presente invención también abarcan promotores utilizados para la transcripción por polimerasas de ARN vírico. Métodos para introducir constructos polinucleótidos en plantas y expresar una proteína codificada en el mismo, implicando ADN vírico o moléculas ARN, se conocen en la técnica. Véase, por ejemplo, las patentes de EE.UU. n.º: 5.889.191, 5.889.190, 5.866.785, 5.589.367 y 5.316.931.

[0059] Las células que han sido transformadas se pueden cultivar en plantas conforme a formas convencionales. Véase, por ejemplo, McCormick *et al.* (1986) *Plant Cell Reports* 5:81-84. Estas plantas pueden luego se cultivan, y bien empolinizan con la misma cepa transformada o cepas diferentes, y el híbrido resultante tienen expresión constitutiva de la característica fenotípica identificada deseada. Dos o más generaciones se pueden cultivar para asegurar que la expresión de la característica fenotípica deseada se mantiene y se hereda de forma estable y luego semillas se cosechan las semillas para asegurar que la expresión de la característica fenotípica deseada se ha conseguido. De esta manera, las formas de realización de la presente invención proporcionan una semilla transformada (también denominada "semilla transgénica") que tiene un constructo de polinucleótido de la presente invención, por ejemplo, un casete de expresión de la presente invención, incorporado de forma estable en su genoma. Las plantas resistentes a los herbicidas descritas aquí encuentran su uso en métodos para controlar las malas hierbas. Así, la divulgación incluye métodos para controlar malas hierbas que estén cerca de una planta resistente a los herbicidas de la presente invención. Los métodos comprenden la aplicación de una cantidad eficaz de un herbicida a los hierbajos y a la planta resistente a los herbicidas, donde la planta tiene resistencia aumentada a uno o más de los siguientes herbicidas, un herbicida IMI, un Herbicida SU, un Herbicida TP, un Herbicida POB y/o mezclas derivadas, cuando se compara con una planta de tipo salvaje.

[0060] Formas de realización de la presente invención proporcionan semillas no transgénicas y transgénicas con tolerancia aumentada a uno o más herbicida, particularmente un herbicida inhibidor de AHAS, más particularmente un herbicida IMI, un Herbicida SU, un Herbicida TP, un Herbicida POB y/o mezclas derivadas. Tales semillas incluyen, por ejemplo, semillas de girasol no transgénicas que comprenden las características de tolerancia a los herbicidas de la planta de girasol RW-B, y semillas transgénicas que comprenden una molécula de polinucleótido de la presente invención que codifica una proteína AHASL resistente a los herbicidas.

Prueba para presencia del gen AHASL mutante

[0061] Las secuencias de nucleótidos de las formas de realización de la presente invención pueden utilizarse para aislar secuencias correspondientes a partir de otros organismos, particularmente otras plantas, más particularmente otras dicotiledóneas. De esta manera, métodos tales como PCR, hibridación y similares pueden utilizarse para identificar tales secuencias basadas en su homología de secuencia con las secuencias expuestas aquí. Secuencias aisladas basadas en su identidad de secuencia con las secuencias de polinucleótidos AHASL enteras expuestas aquí o con fragmentos de las mismas están abarcadas por la presente invención. Así, secuencias de polinucleótidos aislados que codifican para una proteína AHASL y que hibridan bajo condiciones rigurosas a las secuencias descritas aquí o a fragmentos de las mismas, se incluyen en la presente invención.

[0062] En un método de PCR, cebadores oligonucleótidos se pueden diseñar para su uso en reacciones de PCR para amplificar secuencias de ADN correspondientes a partir de ADNc o ADN genómico extraídos de cualquier planta de

interés. Métodos para diseñar cebadores de PCR y clonación de PCR son generalmente conocidos en la técnica. Véase Innis and Gelfand, eds. (1995) *PCR Strategies* (Academic Press, New York) e Innis and Gelfand, eds. (1999) *PCR Methods Manual* (Academic Press, New York). Métodos conocidos de PCR incluyen, pero de forma no limitativa, métodos que utilizan cebadores pareados, cebadores anidados, cebadores específicos únicos, cebadores degenerados, cebadores específicos de gen, cebadores específicos de vector, cebadores parcialmente desequilibrados y similares. Las secuencias de polinucleótidos AHASL de la presente invención se proporcionan en los casetes de expresión para la expresión en la planta de interés. El casete incluirá secuencias reguladoras 5' y 3' operativamente enlazadas a una secuencia de polinucleótidos AHASL de la presente invención. "Operativamente enlazado" es un enlace funcional entre un promotor y una segunda secuencia, donde la secuencia promotora inicia y media la transcripción de la secuencia de ADN que se corresponde con la segunda secuencia. Generalmente, operativamente enlazado significa que las secuencias de ácidos nucleicos que están enlazadas son contiguas y, cuando es necesario para unir dos regiones codificantes proteína, contigua y en lo mismo marco de lectura. El casete puede adicionalmente contener al menos un gen adicional que se va a cotransformar en el organismo. Alternativamente, el(los) gen(es) adicional(es) se puede(n) proporcionar en los casetes de expresión múltiples.

[0063] Tales casetes de expresión disponen de una pluralidad de sitios de restricción para que la inserción de la secuencia de polinucleótidos AHASL esté bajo la regulación transcripcional de las regiones reguladoras. El casete de expresión puede adicionalmente contener genes marcadores seleccionables. El casete de expresión incluirá en la dirección de transcripción 5'-3', una región de iniciación transcripcional y traduccional (es decir, un promotor), una secuencia de polinucleótidos AHASL de la presente invención y una región de terminación transcripcional y traduccional (es decir, región de terminación) funcional en plantas. El promotor puede ser nativo o análogo, o foráneo o heterólogo, del huésped vegetal y/o de las secuencias de polinucleótidos AHASL de la invención. Adicionalmente, el promotor puede ser la secuencia natural o alternativamente una secuencia sintética. Cuando el promotor es "foráneo" o "heterólogo" del huésped vegetal, se entiende que el promotor no se encuentra en la planta nativa en la que se introduce el promotor. Cuando el promotor es "foráneo" o "heterólogo" de la secuencia de polinucleótidos AHASL, se entiende que el promotor no es el promotor nativo o de origen natural para la secuencia de polinucleótidos AHASL operativamente enlazada. Como se utiliza en este caso, un gen quimérico comprende una secuencia codificante operativamente enlazada con una región de iniciación de transcripción que es heterólogo de la secuencia codificante.

[0064] Mientras los polinucleótidos AHASL resistentes a los herbicidas descritos aquí se pueden usar como genes marcadores seleccionables para transformación de plantas, los casetes de expresión que contienen estos polinucleótidos pueden incluir otro gen marcador seleccionable para la selección de células transformadas. Los genes marcadores seleccionables, se utilizan para la selección de células transformadas o tejidos. Los genes marcadores incluyen, pero de forma no limitativa, genes que codifican resistencia al antibiótico, tales como los que codifican la neomicina fosfotransferasa II (NEO) e higromicina fosfotransferasa (HPT), al igual que genes que confieren resistencia a 5 compuestos herbicidas, tales como amonio de glufosinato, bromoxinil, imidazolinonas y 2,4-diclorofenoxiacetato (2,4-D). Véase generalmente, Yarranton (1992) *Curr. Opin. Biotech.* 3:506-511; Christopherson *et al.* (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:6314-6318; Yao *et al.* (1992) *Cell* 1:63-72; Reznikoff (1992) *Mol. Microbiol.* 6:2419-2422; Barkley *et al.* (1980) en *The Operon*, pág. 177-220; Hu *et al.* (1987) *Cell* 48:555-566; Brown *et al.* (1987) *Cell* 10 49:603-612; Figge *et al.* (1988) *Cell* 52:713-722; Deuschle *et al.* (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:5400-5404; Fuerst *et al.* (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:2549-2553; Deuschle *et al.* (1990) *Science* 248:480-483; Gossen (1993) Ph. D. Thesis, University of Heidelberg; Reines *et al.* (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 1917-1921; Labow *et al.* (1990) *Mol. Cell. Biol.* 10:3343-3356; Zambretti *et al.* (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 15 89:3952-3956; Baim *et al.* (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:5072-5076; Wyborski *et al.* (1991) *Nucleic Acids Res.* 19:4647-4653; Hillenand-Wissman (1989) "Topics Mol. Struc. Biol." 10:143-162; Degenkolb *et al.* (1991) *Antimicrob. Agents Chemother.* 35:1591-1595; Kleinschr M *et al.* (1988) *Biochemistry* 27: 1094-1104; Bonin (1993) PhD. Thesis, University of Heidelberg; Gossen *et al.* (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:5547-5551; Oliva *et al.* (1992) *Antimicrob. Agents Chemother.* 36:913-919; Hlavka *et al.* (1985) *Handbook of Experimental Pharmacology*, Vol. 78 (Springer-Verlag, Berlin); Gill *et al.* (1988) *Nature* 334:721-724. La lista anterior de genes marcadores seleccionables no tiene intención de ser limitativa y cualquier gen marcador seleccionable se pueden usar según sea necesario.

[0065] En un método de hibridación, toda o parte de una secuencia de nucleótidos AHASL conocida puede utilizarse para filtrar ADNc o bibliotecas genómicas. Métodos para la construcción de tal ADNc y bibliotecas genómicas son generalmente conocidos en la técnica. Las sondas denominadas de hibridación pueden ser fragmentos de ADN genómico, fragmentos de ADNc, fragmentos de ARN u otros oligonucleótidos, y se pueden marcar con un grupo detectable tal como ³²P, o cualquier otro marcador detectable, tal como otros radioisótopos, un compuesto fluorescente, una enzima o un cofactor enzimático. Sondas para hibridación se pueden hacer mediante la marcación de oligonucleótidos sintéticos basada en la secuencia de nucleótidos AHASL conocida descrita aquí. Cebadores degenerados diseñados basándose en nucleótidos conservados o residuos de aminoácidos en una secuencia de nucleótidos AHASL conocida o secuencia de aminoácidos codificada adicionalmente pueden ser usados. La sonda típicamente comprende una región de secuencia de nucleótidos que hibridiza bajo condiciones rigurosas hasta al menos aproximadamente 12, preferiblemente aproximadamente 25, más preferiblemente aproximadamente 50, 75, 100, 125, 150, 175, 200, 250, 300, 350, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1100 o más nucleótidos consecutivos de una secuencia de nucleótidos AHASL de la presente invención o un fragmento o variante de la misma. La preparación de sondas para hibridación generalmente se conoce en la técnica.

[0066] Por ejemplo, toda la secuencia AHASL descrita aquí, o una o más partes de la misma, se puede utilizar como una sonda capaz de hibridar específicamente a secuencias AHASL correspondientes y ARNs mensajeros. Técnicas de hibridación incluyen selección de hibridación de bibliotecas de ADN en placas (bien placas o colonias). La hibridación de tales secuencias se puede realizar bajo condiciones rigurosas. Los términos "condiciones rigurosas" o "condiciones de hibridación rigurosa" se refieren, para fines de esta invención, a condiciones bajo las que una sonda hibridará a su secuencia objetivo en un grado detectablemente superior al de otras secuencias (por ejemplo, al menos 2 veces que los antecedentes). Las condiciones rigurosas son dependientes de la secuencia y serán diferentes en diferentes circunstancias. Típicamente, las condiciones rigurosas serán aquellas donde la concentración de sal sea inferior a aproximadamente 1,5 M de ión de Na, típicamente aproximadamente de 0,01 a 1,0 M de concentración iónica de Na (u otras sales) a pH 7,0 a 8,3 y la temperatura sea al menos aproximadamente de 30°C para sondas cortas (por ejemplo, de 10 a 50 nucleótidos) y al menos aproximadamente 60°C para sondas largas (por ejemplo, más de 50 nucleótidos). Las condiciones rigurosas también se pueden conseguir con la adición de agentes desestabilizantes tales como formamida. Las condiciones de astringencia bajas ejemplares incluyen hibridación con una solución tamponada de 30 a 35% de formamida, 1 M de NaCl, 1% de SDS (dodecilsulfato sódico) a 37°C, y un lavado en IX a 2X SSC (20X SSC = 3,0 M NaCl/0,3 M citrato de trisodio) a 50 a 55°C. Condiciones de astringencia moderadas ejemplares incluyen hibridación en 40 a 45% de formamida, 1,0 M de NaCl, 1% de SDS a 37°C y un lavado en 0,5X a IX SSC a 55 a 60°C. Condiciones de astringencia altas ejemplares incluyen hibridación en 50% de formamida, 1 M de NaCl, 1% de SDS a 37°C y un lavado en 0,1X SSC a 60 a 65°C. Opcionalmente, tampones de lavado pueden comprender de aproximadamente 0,1% a aproximadamente 1% SDS. La duración de hibridación es generalmente menos de aproximadamente 24 horas, normalmente de aproximadamente 4 a aproximadamente 12 horas.

[0067] La especificidad es típicamente la función de lavados de post-hibridación, los factores críticos son la fuerza iónica y la temperatura de la solución de lavado final. Para ADN-híbridos de ADN, la T_m se puede aproximar a partir de la ecuación de Meinkoth and Wahl (1984) Anal. Biochem. 138:267-284: $T_m = 81,5^\circ\text{C} + 16,6 (\log M) + 0,41 (\%GC) - 0,61 (\% \text{ form}) - 500/L$ donde M es la molaridad de cationes monovalentes, %GC es el porcentaje de nucleótidos de guanina y citosina en el ADN, % de form es el porcentaje de formamida en la solución de hibridación, y L es la longitud del híbrido en pares de bases. La T_m es la temperatura (bajo fuerza iónica y pH definidos) a la que 50% de una secuencia objetivo complementaria hibrida a una sonda perfectamente unida. La T_m se reduce en aproximadamente 1°C por cada 1% de no coincidencia; así, la T_m , la hibridación y/o las condiciones de lavado se pueden ajustar para hibridar a secuencias de la identidad deseada. Por ejemplo, si las secuencias con >90% de identidad están presentes, la T_m se pueden disminuir 10°C. Generalmente, las condiciones de astringencia se seleccionan por ser aproximadamente 5°C inferiores que punto de fusión térmico (T_m) para la secuencia específica y su complemento en una fuerza iónica y pH definidos. Sin embargo, condiciones de astringencia severas pueden utilizar una hibridación y/o lavado a 1, 2, 3 o 4°C inferiores al punto de fusión térmico (T_m); condiciones de astringencia moderadas pueden utilizar una hibridación y/o lavado a 6, 7, 8, 9 o 10°C inferiores al punto de fusión térmico (T_m); condiciones de astringencia bajas pueden utilizar una hibridación y/o lavado a 11, 12, 13, 14, 15 o 20°C inferiores al punto de fusión térmico (T_m). Utilizando la ecuación, hibridación y composiciones de lavado, y la T_m deseada, los expertos entenderán que variaciones en la astringencia de hibridación y/o soluciones de lavado están intrínsecamente descritas. Si el grado deseado de no coincidencia da como resultado una T_m inferior a 45°C (solución acuosa) o 32°C (solución de formamida), se prefiere aumentar la concentración de SSC de modo que una temperatura más alta se pueda usar. Una guía extensa para la hibridación de ácidos nucleicos se encuentra en Tijssen (1993) Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology - Hybridization with Nucleic Acid Probes, Parte I, Capítulo 2 (Elsevier, and Ausubel *et al.*, eds. (1995) Current Protocols in Molecular Biology, Capítulo 2 (Greene Publishing and Wiley-Interscience, New York).

45 Transgénesis y optimización de expresión

[0068] Se proporcionan métodos para mejorar la actividad de AHAS en una planta por transformación de una planta con un constructo de polinucleótidos que tiene un promotor operativamente enlazado a una secuencia de nucleótidos AHASL1 de la presente invención. Los métodos implican introducción de un constructo de polinucleótidos de la invención en al menos una célula vegetal y regeneración de una planta transformada utilizando un promotor capaz de dirigir la expresión génica en una célula vegetal. Preferiblemente, tal promotor es un promotor constitutivo o un promotor preferido de tejido. Los métodos encuentran uso en el aumento de la resistencia o tolerancia de una planta a al menos un herbicida, y ventajosamente dos, tres o cuatro o más herbicidas que interfieren con la actividad catalítica de la enzima AHAS, particularmente un herbicida IMI, un herbicida SU, un herbicida TP, un herbicida POB y/o mezclas derivadas.

[0069] Cuando proceda, el(los) gen(s) se puede(n) optimizar para expresión aumentada en la planta transformada. Esto es, los genes se pueden sintetizar utilizando codones preferidos por las plantas para expresión mejorada. Véase, por ejemplo, Campbell and Gowri (1990) Plant Physiol 92: 1- 11 para una discusión del uso del codón preferido como huésped. Métodos están disponibles en la técnica para sintetizar genes preferidos por las plantas. Véase, por ejemplo, patente de EE.UU. n.º.: 5.380.831 y 5.436.391 y Murray *et al.* (1989) Nucleic Acids Res. 17:477-498.

[0070] Modificaciones de secuencia adicionales se conocen por mejorar la expresión génica en un huésped celular. Estas incluyen eliminación de secuencias que codifican señales de poliadenilación falsa, señales de sitio de empalme exón-intrón, repetidores tipo transposón y otras secuencias tan bien caracterizadas que pueden ser deletéreas para la expresión génica. El contenido G-C de la secuencia se puede ajustar a niveles promedio para un huésped celular dado,

como se calcula por referencia para genes conocidos expresados en la célula huésped. Cuando es posible, la secuencia se modifica para evitar estructuras de ARNm secundario de horquilla predichas. Las secuencias de nucleótidos para mejorar la expresión génica también pueden usarse en los vectores de expresión vegetales. Estos incluyen los intrones del maíz Adhl, gen del intrón I (Callis *et al.* Genes and Development 1:1183-1200,1987), y secuencias líder, (W-secuencia) del virus del mosaico del tabaco (TMV), Virus del moteado clorótico del maíz y virus del mosaico de la alfalfa (Gallie *et al.* Nucleic Acid Res. 15:8693-8711,1987 y Skuzeski *et al.* Plant Mol.Biol. 15:65-79,1990). El primer intrón del locus shrunken-1 de maíz, ha demostrado que aumenta la expresión de genes en los constructos de gen quimérico. Las patentes de EE.UU. n.º: 5.424.412 y 5.593.874 describen el uso de intrones específicos en los constructos de expresión génica, y Gallie *et al.* (Plant Physiol. 106:929-939, 1994) también han mostrado que los intrones son útiles para regular la expresión génica en una base específica de tejido. Para mejorar adicionalmente o para optimizar la expresión génica de la subunidad grande AHAS, los vectores de expresión vegetales de la presente invención también pueden contener secuencias de ADN que contengan regiones de unión a la matriz (MARs). Células vegetales transformadas con tales sistemas de expresión modificados, luego, pueden mostrar sobreexpresión o expresión constitutiva de una secuencia de nucleótidos de la presente invención.

[0071] Los casetes de expresión pueden adicionalmente contener secuencias líder 5' en el constructo del casete de expresión. Tales secuencias líder pueden actuar para mejorar la traducción. Los líderes de traducción se conocen en la técnica e incluyen: líderes de picornavirus, por ejemplo, líder EMCV (región no codificante 5' de encefalomiocarditis) (Elroy-Stein *et al.* (1989) Proc. Natl Acad. Sci. USA 86:6126-6130); líderes de potivirus, por ejemplo, líder TEV (virus del grabado del tabaco) (Gallie *et al.* (1995) Gene 165(2):233-238), líder MDMV (virus del mosaico enano de maíz) (Virology 154:9-20), y proteína de unión a la cadena pesada de inmunoglobulina humana (BiP) (Macejak *et al.* (1991) Nature 353:90-94); líder no traducido del ARNm de proteína de revestimiento del virus de mosaico de alfalfa (AMV RNA 4) (Jobling *et al.* (1987) Nature 325:622-625); líder de virus de mosaico de tabaco (TMV) (Gallie *et al.* (1989) en Molecular Biology of RNA, ed. Cech (Liss, Nueva York), págs. 237-256); y líder de virus del moteado clorótico de maíz (MCMV) (Lommel *et al.* (1991) Virology 81:382-385). Véase también, Della-Cioppa *et al.* (1987) Plant Physiol. 84:965-968. Otros métodos conocidos para mejorar la traducción también se pueden utilizar, por ejemplo, intrones y similares. Al preparar el casete de expresión, los diferentes fragmentos de ADN pueden ser manipulados, para proporcionar a las secuencias de ADN en la orientación adecuada y, según sea apropiado, en el marco de lectura apropiado. Con este fin, adaptadores o enlaces se pueden emplear para unir los fragmentos de ADN u otras manipulaciones se pueden utilizar para proporcionar sitios de restricción convenientes, retirada de ADN superfluo, retirada de sitios de restricción o similares. Con este fin, mutagénesis in vitro, reparación de cebador, restricción, recocimiento, resustituciones, por ejemplo, transiciones y transversiones, pueden estar implicadas.

[0072] Casetes de expresión para expresar polinucleótidos en plantas, tejidos vegetales, células vegetales y otras células huésped se proporcionan. Los casetes de expresión tienen un promotor expresable en la planta, tejido vegetal, célula vegetal u otras células huésped de interés operativamente enlazadas a un polinucleótido de la invención que tiene una secuencia de nucleótidos que codifica bien una proteína AHASL en toda su longitud (es decir, incluyendo el péptido de tránsito de cloroplasto) o madura (es decir sin el péptido de tránsito de cloroplasto). Si se desea una expresión en los plástidos o cloroplastos de plantas o células vegetales, el casete de expresión también puede tener una secuencia dirigida a cloroplasto operativamente enlazada que codifique un péptido de tránsito de cloroplasto. Tales casetes de expresión se pueden usar en un método para el mejorar la tolerancia al herbicida de una planta o una célula huésped. El método implica la transformación de la planta o célula huésped con un casete de expresión que contiene un promotor que es expresable en la planta o célula huésped de interés y el promotor está operativamente enlazado a un polinucleótido de una forma de realización de la presente invención que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica, por ejemplo, un herbicida IMI, un herbicida SU, un herbicida TP o una proteína AHASL resistente al herbicida POB.

[0073] El uso del término "constructos polinucleótidos" no está limitado a ADN. Aquellos técnicos en la materia reconocerán que constructos polinucleótidos, particularmente polinucleótidos y oligonucleótidos, compuestos de ribonucleótidos y combinaciones de ribonucleótidos y desoxirribonucleótidos también se pueden emplear en los métodos descritos aquí. Tales desoxirribonucleótidos y ribonucleótidos incluyen tanto moléculas de origen natural como análogos sintéticos. Los constructos polinucleótidos de la invención también abarcan todos los tipos de constructos polinucleótidos incluyendo, pero no limitado a, formas monocatenarias, formas bicatenarias, horquillas, estructuras de tallo-y-bucle, y similares. Además, se entiende por aquellos técnicos en la materia que cada secuencia de nucleótidos descrita aquí también incluye el complemento de esta secuencia de nucleótidos ejemplificada.

[0074] Los métodos de la invención pueden emplear un constructo de polinucleótidos que sea capaz de dirigir, en una planta transformada, la expresión de al menos una proteína, o al menos un ARN, tal como, por ejemplo, un ARN antisentido que sea complementario con al menos una parte de un ARNm. Típicamente, tal constructo de polinucleótido está compuesto por una secuencia codificante para una proteína o un ARN operativamente enlazado a las regiones reguladoras transcripcionales 5' y 3'. Alternativamente, un constructo de polinucleótido se puede utilizar que no sea capaz de dirigir, en una planta transformada, la expresión de una proteína o un ARN. Para la expresión de un polinucleótido de la presente invención en una célula huésped de interés, el polinucleótido está típicamente operativamente enlazado a un promotor que sea capaz de dirigir la expresión génica en la célula huésped de interés. Los métodos para la expresión de los polinucleótidos en células huésped no dependen de promotor particular, e incluyen el uso de cualquier promotor que sea conocido en la técnica y que sea capaz de dirigir la expresión génica en

la célula huésped de interés.

[0075] Mientras que puede ser preferible expresar polinucleótidos AHASL que usen promotores heterólogos, las secuencias promotoras nativas pueden ser utilizadas. Tales constructos cambiarían los niveles de expresión de la proteína AHASL en la planta o célula vegetal. Así, el fenotipo de la planta o célula vegetal es alterado. La región de terminación puede ser nativa con la región de iniciación transcripcional, puede ser nativa con la secuencia AHASL operativamente enlazada de interés, puede ser nativa con el huésped vegetal, o puede derivarse de otra fuente (es decir, foránea o heteróloga al promotor, la secuencia de polinucleótidos AHASL de interés, el huésped vegetal o cualquier combinación de los mismos). Regiones de terminación convenientes están disponibles del plásmido-Ti de *A. tumefaciens*, como las regiones de terminación de octopina sintasa y nopalina sintasa. Véase también Guerineau *et al.* (1991) *Mol. Gen. Genet.* 262:141-144; Proudfoot (1991) *Cell* 64:671-674; Sanfacon *et al.* (1991) *Genes Dev.* 5: 141-149; Mogen *et al.* (1990) *Plant Cell* 2: 1261-1272; Munroe *et al.* (1990) *Gene* 91:151-158; Ballas *et al.* (1989) *Nucleic Acids Res.* 17:7891-7903; y Joshi *et al.* (1987) *Nucleic Acid Res.* 15:9627-9639.

[0076] Varios promotores se pueden usar en la práctica de la invención y se pueden seleccionar basados en los resultados deseados. Los ácidos nucleicos se pueden combinar con promotores constitutivos, preferido por el tejido u otros para la expresión vegetal. Tales promotores constitutivos incluyen, por ejemplo, el promotor de núcleo del promotor Rsyn7 y otros promotores constitutivos descritos en la WO 99/43838 y la patente de EE.UU. n.º: 6.072.050; el promotor CaMV 35S de núcleo (Odell *et al.* (1985) *Nature* 313:810-812); actina de arroz (McElroy *et al.* (1990) *Plant Cell* 2: 163-171); ubiquitina (Christensen *et al.* (1989) *Plant Mol. Biol.* 12:619-632 y Christensen *et al.* (1992) *Plant Mol. Biol.* 18:675-689); pEMU (Last *et al.* (1991) *Theor. Appl. Genet.* 81:581-588); MAS (Velten *et al.* (1984) *EMBO J.* 3:2723-2730); promotor ALS (patente de EE.UU. n.º: 5.659.026) y similares. Otros promotores constitutivos incluyen, por ejemplo, las patentes de EE.UU. n.º: 5.608.149; 5.608.144; 5.604.121; 5.569.597; 5.466.785; 5.399.680; 5.268.463; 5.608.142; y 6.177.611. Promotores preferidos de tejido se pueden utilizar para obtener expresión AHASL mejorada dentro de un tejido vegetal particular. Tales promotores preferidos de tejido incluyen, pero de forma no limitativa, promotores preferidos de hoja, promotores preferidos de raíz, promotores preferidos de semilla y promotores preferidos de tallo. Promotores preferidos de tejido, son descritos en, por ejemplo, Yamamoto *et al.* (1997) *Plant J.* 12(2):255-265; Kawamata *et al.* (1997) *Plant Cell Physiol.* 38(7):792-803; Hansen *et al.* (1997) *Mol. Gen. Genet.* 254(3):337-343; Russell *et al.* (1997) *Transgenic Res.* 6(2): 157-168; Rinehart *et al.* (1996) *Plant Physiol.* 112(3): 1331- 1341; Van Camp *et al.* (1996) *Plant Physiol.* 112(2):525-535; Canevascini *et al.* (1996) *Plant Physiol.* 112(2):513-524; Yamamoto *et al.* (1994) *Plant Cell Physiol.* 35(5):773- 778; Lam (1994) *Results Prob I. Cell Differ.* 20:181-196; Orozco *et al.* (1993) *Plant Mol. Biol.* 23(6): 1129-1138; Matsuoka *et al.* (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90(20):9586- 9590; and Guevara-Garcia *et al.* (1993) *Plant J.* 4(3):495-505. Tales promotores pueden ser modificados, si es necesario, para expresión débil.

[0077] En una forma de realización, los ácidos nucleicos de interés están dirigidos al cloroplasto para la expresión. De esta manera, donde el ácido nucleico de interés no está directamente insertado en el cloroplasto, el casete de expresión contendrá adicionalmente una secuencia dirigida al cloroplasto que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un péptido de tránsito de cloroplasto para dirigir el producto génico de interés a los cloroplastos. Tales péptidos de tránsito se conocen en la técnica. Con respecto a las secuencias dirigidas a cloroplasto, "operativamente enlazado" significa que la secuencia de ácidos nucleicos que codifica un péptido de tránsito (es decir, la secuencia dirigida a cloroplasto) se enlaza al polinucleótido AHASL de manera que las dos secuencias sean contiguas y estén en el mismo marco de lectura. Véase, por ejemplo, Von Heijne *et al.* (1991) *Plant Mol. Biol. Rep.* 9: 104-126; Clark *et al.* (1989) *J. Biol. Chem.* 264: 17544-17550; Della-Cioppa *et al.* (1987) *Plant Physiol.* 84:965-968; Romer *et al.* (1993) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 196:1414-1421; y Shah *et al.* (1986) *Science* 233:478-481.

[0078] Mientras las proteínas AHASL descritas aquí pueden incluir un péptido de tránsito de cloroplasto nativo, cualquier péptido de tránsito de cloroplasto conocido en la técnica se puede fusionar con la secuencia de aminoácidos de una proteína AHASL madura de la presente invención conectando operativamente una secuencia dirigida a cloroplasto al extremo 5' de una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína AHASL madura.

[0079] Secuencias que de cloroplasto se conocen en la técnica e incluyen la subunidad pequeña de cloroplasto de ribulosa-1,5-bisfosfato carboxilasa (Rubisco) (de Castro Silva Filho *et al.* (1996) *Plant Mol. Biol.* 30:769-780; Schnell *et al.* (1991) *J. Biol. Chem.* 266(5):3335-3342) 5-(enolpiruvil)shikimato-3-fosfato sintasa (EPSPS) (Archer *et al.* (1990) *J. Bioenerg. Biomemb.* 22(6):789-810) triptófano sintasa (Zhao *et al.* (1995) *J. Biol. Chem.* 270(11):6081-6087) plastocianina (Lawrence *et al.* (1997) *J. Biol. Chem.* 272(33):20357-20363) corismato sintasa (Schmidt *et al.* (1993) *J. Biol. Chem.* 268(36):27447-27457) y la clorofila captadora de luz a/b proteína de unión (LHBP) (Lamppa *et al.* (1988) *J. Biol. Chem.* 263:14996-14999). Véase también Von Heijne *et al.* (1991) *Plant Mol. Biol. Rep.* 9: 104-126; Clark *et al.* (1989) *J. Biol. Chem.* 264: 17544- 17550; Della-Cioppa *et al.* (1987) *Plant Physiol.* 84:965-968; Romer *et al.* (1993) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 196: 1414-1421; y Shah *et al.* (1986) *Science* 233:478-481.

[0080] Métodos para transformar cloroplastos se conocen en la técnica. Véase, por ejemplo, Svab *et al.* (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:8526-8530; Svab and Maliga (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:913-917; Svab and Maliga (1993) *EMBO J.* 12:601- 606. El método se basa en la entrega con pistola de partículas de ADN que contiene un marcador seleccionable y la dirección del ADN al genoma plásmido a través de recombinación homóloga. Adicionalmente, la transformación plásmida lo que se puede realizar por transactivación de un transgén de borne plásmido silencioso por expresión preferida de tejido de una ARN-polimerasa codificada nuclear y dirigida a plásmido. Tal sistema

ha sido proporcionado en McBride *et al.* (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:7301-7305.

[0081] Los ácidos nucleicos de interés para dirigirlos al cloroplasto se pueden optimizar para la expresión en el cloroplasto para dar cuenta de las diferencias en el uso de codón entre el núcleo vegetal y este orgánulo. De esta manera, los ácidos nucleicos de interés se pueden sintetizar utilizando codones preferidos por el cloroplasto. Véase, por ejemplo, patente de EE.UU. n.º: 5.380.831.

[0082] Como se describe en este caso, las secuencias de nucleótidos AHASL de las formas de realización de la presente invención encuentran uso en la mejora de la tolerancia al herbicida de plantas que comprenden en sus genomas un gen que codifica de una proteína AHASL tolerante a los herbicidas. Tal gen puede ser un gen endógeno o un transgén. Adicionalmente, en formas de realización determinadas, las secuencias de ácidos nucleicos de la presente invención se pueden apilar con cualquier una combinación de secuencias polinucleótidas de interés para crear plantas con un fenotipo deseado. Por ejemplo, los polinucleótidos se pueden apilar con cualquier otro polipéptido que codifique polinucleótidos que tenga actividad pesticida y/o insecticida, tal como, por ejemplo, las proteínas de toxina de *Bacillus thuringiensis* (descrita en las patentes de EE.UU. n.º: 5.366.892, 5.747.450, 5.737.514, 5.723.756, 5.593.881; y Geiser *et al.* (1986) Gene 48:109). Las combinaciones generadas también pueden incluir copias múltiples de cualquiera de los polinucleótidos de interés.

[0083] Las secuencias de nucleótidos descritas aquí también se puede usar en la orientación sentido para suprimir la expresión de genes endógenos en plantas. Métodos para suprimir la expresión génica en plantas utilizando secuencias de nucleótidos en la orientación sentido se conocen en la técnica. Los métodos generalmente implican la transformación de plantas con un constructo de ADN que comprende un promotor que dirige la expresión en una planta operativamente enlazada a al menos una parte de una secuencia de nucleótidos que corresponde a la transcripción del gen endógeno. Típicamente, tal secuencia de nucleótidos tiene identidad de secuencia sustancial a la secuencia de la transcripción del gen endógeno, preferiblemente mayor de aproximadamente 65% de identidad de secuencia, más preferiblemente mayor de aproximadamente 85% de identidad de secuencia, de la forma más preferible mayor de aproximadamente 95% de identidad de secuencia. Véase patentes de EE.UU. n.º: 5.283.184 y 5.034.323.

[0084] También se proporcionan métodos para aumentar la resistencia al herbicida de una planta de girasol a través del cultivo de planta convencional que implica la reproducción sexual. Los métodos comprenden cruzamiento de una primera planta de girasol que sea resistente a un herbicida con una segunda planta de girasol que puede ser o no resistente al herbicida o puede ser resistentes a diferente herbicida o herbicidas que la primera planta. La primera planta puede ser cualquiera de las plantas resistentes al herbicida descritas aquí, incluyendo, por ejemplo, RW-B. La segunda planta puede ser cualquier planta que sea capaz de producir plantas descendientes viables (es decir, semillas) cuando se cruza con la primera planta. Típicamente, pero no necesariamente, la primera y la segunda plantas son de las mismas especies de girasol. Las plantas descendientes producidas por este método tienen resistencia aumentada a un herbicida cuando se compara con la primer o segunda planta o ambas. Cuando la primera y la segunda plantas son resistentes a herbicidas diferentes, las plantas descendientes tendrán las características de tolerancia al herbicida combinadas de la primeras y la segunda planta. Estos métodos pueden además implicar a una o más generaciones de retrocruce de las plantas descendientes del primer cruce con una planta de la misma línea o genotipo ya sea la primera o la segunda planta. Alternativamente, la progenie del primer cruce o cualquier cruce posterior se puede cruzar con una tercera planta que sea de una línea o genotipo diferente de la primera o segunda planta. Además, estos métodos pueden adicionalmente implicar la selección de plantas que comprendan las características de tolerancia al herbicida de la primera planta, la segunda planta, o la primera y la segunda planta.

Métodos de control de hierbas

[0085] Las plantas de cultivo de girasol se rotan frecuentemente con cereales, tal como el trigo. Los herbicidas SU se emplean frecuentemente como parte del sistema de control de hierbas del trigo. Además de los herbicidas SU, los herbicidas IMI se pueden usar como parte del sistema de control de hierbas del trigo cuando se cultivan trigos IMI. El uso de estos herbicidas en una rotación de trigo/girasol produce daño por arrastre. El daño por arrastre de herbicida de girasol se produce cuando los residuos de un herbicida aplicado a la planta de cultivo precedente, en este ejemplo SU o IMI aplicado al trigo, están presentes en la tierra cuando una planta de cultivo de girasol se planta. De hecho, diferentes herbicidas pueden causar daño por arrastre al girasol, incluyendo muchos inhibidores de AHAS (Blamei *et al.*, 1997). El daño a las plantas de cultivo de girasol se puede reducir usando cultivos de girasol resistentes al herbicida.

[0086] Los cultivos de girasol resistentes al herbicida, sin embargo, muestran gran especificidad y su uso solo permite la pulverización de la misma familia de herbicida en la post-emergencia. Por ejemplo, para proteger una planta de cultivo de girasol del arrastre SU, cultivos resistentes al SU se pueden usar. El uso de cultivos resistentes al SU permite solo que se pulvericen herbicidas SU sobre la planta de cultivo de girasol. Actualmente, solo cultivos específicos resistentes al SU o resistentes a IMI se han mostrado, no se ha descrito ningún cultivo que muestre resistencia cruzada a inhibidores de AHAS diferentes. Sorprendentemente, y de forma imprevista, la presencia del gen descrito aquí y la expresión de la proteína AHAS correspondiente protege las plantas de cultivo de girasol del daño por arrastre potencial provocado por herbicidas inhibidores de AHAS y posteriormente, permite la pulverización de una variedad de herbicidas inhibidores de AHAS para controlar los hierbajos en la post-emergencia. Esta capacidad para usar una variedad de herbicidas para el control de hierbas en una planta de cultivo de girasol proporciona una oportunidad mucho mayor para

los productores de controlar la infestación de hierba en las plantas de cultivo de girasol.

[0087] El sorprendente descubrimiento de una proteína AHAS que tiene resistencia a múltiples herbicidas permite:

1. La posibilidad de aplicar nuevos tipos de herbicidas inhibidores de AHAS para el control de hierbas en la planta de cultivo de girasol (es decir: POBs y TP) o el registro en el girasol de herbicidas bien conocidos usados en otras plantas de cultivo.
2. La mezcla de dos o más de los herbicidas para la aplicación al mismo tiempo en la planta de cultivo de girasol debido a los altos niveles de resistencia cruzada a las diferentes familias de herbicidas inhibidores de AHAS. Adicionalmente, la resistencia cruzada permite diseñar y desarrollar formulaciones de herbicidas nuevas que pueden combinar diferentes herbicidas inhibidores de AHAS con el objetivo de aumentar el control del espectro de hierbas en el girasol.
3. Mayor flexibilidad en la gestión de los herbicidas para el control de hierbas en el girasol, esto es, más de un tipo de herbicida se puede elegir y aplicar en momentos diferentes en la misma temporada dependiendo del tipo de hierba que se quiera controlar.
4. Resistencia al arrastre de herbicida de la planta de cultivo precedente y, al mismo tiempo, resistencia a otro herbicida inhibidor de AHAS aplicado en la post-emergencia.

[0088] El control de la vegetación no deseada se entiende que se refiere a destruir los hierbajos y/o de otro modo retardar o inhibir el crecimiento normal de los hierbajos. Los hierbajos, en el sentido más amplio, se entiende que se refiere a todas esas plantas que crecen en ubicaciones donde son indeseadas. Ejemplos de hierbajos incluyen pero de forma no limitativa, por ejemplo, hierbajos dicotiledóneos e monocotiledóneos. Hierbajos dicotiledóneos incluyen, pero de forma no limitativa, hierbajos de los géneros: Sinapis, Lepidium, Galium, Stellaria, Matricaria, Anthemis, Galinsoga, Chenopodium, Urtica, Senecio, Amaranthus, Portulaca, Xanthium, Convolvulus, Ipomoea, Polygonum, Sesbania, Ambrosia, Cirsium, Carduus, Sonchus, Solanum, Rorippa, Rotula, Lindernia, Lamium, Veronica, Abutilon, Emex, Datura, Viola, Galeopsis, Papaver, Centaurea, Trifolium, Ranunculus y Taraxacum. Hierbajos monocotiledóneos incluyen, pero de forma no limitativa, hierbajos de los géneros: Echinochloa, Setaria, Panicum, Digitaria, Phleum, Poa, Festuca, Eleusine, Brachiaria, Lolium, Bromus, Avena, Cyperus, Sorghum, Agropyron, Cynodon, Monochoria, Fimbristylis, Sagittaria, Eleocharis, Scirpus, Paspalum, Ischaemum, Sphenoclea, Dactyloctenium, Agrostis, Alopecurus y Apera.

[0089] Además, los hierbajos puede incluir, por ejemplo, plantas de cultivo que estén crecimiento en una ubicación no deseada. Por ejemplo, una planta de maíz voluntaria que esté en un campo que predominantemente tenga plantas de girasol se puede considerar una hierba, si la planta de maíz no es deseada en el campo de plantas de girasol.

[0090] Formas de realización de la presente invención describen métodos para aumentar la tolerancia o resistencia de una planta, tejido vegetal, célula vegetal u otra célula huésped a uno o más herbicidas que interfieren con la actividad de la enzima AHAS Preferiblemente, tal herbicida es un herbicida IMI, un herbicida SU, un herbicida TP, un herbicida POB y/o mezclas derivadas. Ventajosamente resistencia o tolerancia aumentada a dos o más de los herbicidas anteriores. Más ventajosamente, resistencia o tolerancia aumentada a tres o más de los herbicidas anteriores. Muchos ventajosamente, resistencia o tolerancia aumentada a cuatro o más de los herbicidas anteriores. Los herbicidas IMI pueden incluir, pero de forma no limitativa, PURSUIT® (imazetapir), CADRE® (imazapic), RAPTOR® (imazamox), SCEPTER® (imazaquina), ASSERT® (imazetabenz), ARSENAL® (imazapir), un derivado de cualquiera de los herbicidas anteriormente mencionados, y una mezcla de dos o más de los herbicidas anteriormente mencionados, por ejemplo, imazapir/imazamox (ODYSSEY®). El herbicida IMI se puede seleccionar de, pero no está limitado a, ácido 2-(4-isopropil-4-metil-5-oxo-2-imidazolin-2-il)-nicotínico, ácido [2-(4-isopropil-4-metil-5-oxo-2-imidazolin-2-il)-3-quinolinocarboxílico], ácido [5-etil-2-(4-isopropil-4-metil-5-oxo-2-imidazolin-2-il)-nicotínico, ácido 2-(4-isopropil-4-metil-5-oxo-2-imidazolin-2-il)-5-(metoximetil)-nicotínico, [ácido 2-(4-isopropil-4-metil-5-oxo-2-imidazolin-2-il)-5-metil-nicotínico y una mezcla de metil-[6-(4-isopropil-4-metil-5-oxo-2-imidazolin-2-il)-m-toluato y metil-[2-(4-isopropil-4-metil-5-oxo-2-imidazolin-2-il)-p-toluato. El uso de ácido 5-etil-2-(4-isopropil-4-metil-5-oxo-2-imidazolin-2-il)-nicotínico y ácido [2-(4-isopropil-4-metil-5-oxo-2-imidazolin-2-il)-5-(metoximetil)-nicotínico es preferido. El uso de ácido [2-(4-isopropil-4-metil-5-oxo-2-imidazolin-2-il)-5-(metoximetil)-nicotínico es particularmente preferido.

[0091] Los herbicidas SU puede incluir, pero de forma no limitativa, clorsulfurón, metsulfurón metil, sulfometurón metil, clorimurón etil, tifensulfurón metil, tribenurón metil, bensulfurón metil, nicosulfurón, etametsulfurón metil, rimsulfurón, triflusalurón metil, triasulfurón, primisulfurón metil, cinosulfurón, amidosulfurón, fluzasulfurón, imazosulfurón, pirazosulfurón etil, halosulfurón, azimsulfurón, ciclosulfurón, etoxisulfurón, flazasulfurón, flupirsulfurón metil, foramsulfurón, iodosulfurón, oxasulfurón, mesosulfurón, prosulfurón, sulfosulfurón, trifloxisulfurón, tritosulfurón, derivados de cualquiera de los herbicidas anteriormente mencionados, y una mezcla de dos o más de los herbicidas anteriormente mencionados.

[0092] Los herbicidas TP pueden incluir, pero de forma no limitativa, cloransulam, diclosulam, florasulam, flumetsulam, metosulam y penoxsulam.

[0093] Los herbicidas POB pueden incluir, pero de forma no limitativa, bispiribac, piritiobac, piriminobac, piribenzoxim y pirifthalid.

[0094] Se reconoce que los herbicidas POB están cercanamente relacionados con los herbicidas de

pirimidiniltiobenzoato y se generalizan en el epígrafe de este último nombre por la *Weed Science Society of America*. Por consiguiente, los herbicidas pueden incluir herbicidas de pirimidiniltiobenzoato, incluyendo, pero no limitado a, los herbicidas POB anteriormente descritos. En vista de lo anterior, los solicitantes usan los términos pirimidiniltiobenzoato y pirimidiniloxibenzoato de forma intercambiable con la abreviatura POB.

[0095] El uso de los herbicidas enumerados aquí no tiene intención de limitar la presente invención a un herbicida específico o familia específica de herbicidas. Los técnicos en la materia reconocerán que otros herbicidas también puede ser empleados.

[0096] Proporcionando plantas que tienen resistencia aumentada a los herbicidas, se pueden emplear una amplia variedad de formulaciones para proteger las plantas de girasol de los hierbajos, de modo que se mejore el crecimiento de la planta de girasol y se reduzca la competencia por nutrientes. Un herbicida se puede usar por sí mismo para pre-emergencia, post-emergencia, pre-siembra y en el control de siembra de hierbajos en áreas circundantes de las plantas descritas aquí. En una forma de realización, una formulación de herbicida IMI se puede usar que contenga otros aditivos. En otra forma de realización, una formulación de herbicida SU se puede usar que contenga otros aditivos. En otra forma de realización, una formulación de herbicida TP se puede usar que contenga otros aditivos. En otra forma de realización, una formulación de herbicida POB se puede usar que contenga otros aditivos. El(los) herbicida(s) también pueden usarse como un tratamiento de semilla. Aditivos encontrados en formulaciones de un herbicida IMI, un herbicida SU, un herbicida TP, un herbicida POB y/o mezclas derivadas pueden incluir otros herbicidas, detergentes, adyuvantes, agentes de extensión, agentes de adherencia, agentes estabilizantes o similares. La formulación de herbicida puede ser una preparación húmeda o seca y pueden incluir, pero no está limitado a, polvos fluibles, concentrados emulsionables y concentrados líquidos. El herbicida y las formulaciones herbicidas se pueden aplicar conforme a métodos convencionales, por ejemplo, pulverizando, regando, espolvoreando o similares. En estos métodos, el herbicida inhibidor de AHAS se puede aplicar por cualquier método conocido en la técnica incluyendo, pero no limitado a, tratamiento de semilla, tratamiento de tierra y tratamiento foliar.

[0097] Antes de la aplicación, el herbicida inhibidor de AHAS se puede convertir en las formulaciones habituales, por ejemplo soluciones, emulsiones, suspensiones, polvos, pulverizados, pastas y gránulos. La forma de uso depende del fin particular destinado; en cada caso, debería asegurar una distribución fina y uniforme del compuesto según la presente invención.

[0098] Las formulaciones se preparan de una manera conocida (véase, por ejemplo, para revisión US 3.060.084, EP-A 707 445 (para concentrados líquidos), Browning, "Agglomeration", Chemical Engineering, Dec. 4, 1967, 147-48, Perry's Chemical Engineer's Handbook, 4th Ed., McGraw-Hill, New York, 1963, páginas 8-57 y *et seq.* WO 91/13546, US 4.172.714, US 4.144.050, US 3.920.442, US 5.180.587, US 5.232.701, US 5.208.030, GB 2.095.558, US 3.299.566, Klingman, Weed Control as a Science, John Wiley and Sons, Inc., New York, 1961, Hance *et al.*, Weed Control Handbook, 8th Ed., Blackwell Scientific Publications, Oxford, 1989 and Mollet, H., Grubemann, A., Formulation technology, Wiley VCH Verlag GmbH, Weinheim (Germany), 2001, 2. D. A. Knowles, Chemistry and Technology of Agrochemical Formulations, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 1998 (ISBN 0-7514-0443-8), por ejemplo mediante la extensión del compuesto activo con productos auxiliares adecuados para la formulación de agroquímicos, tales como solventes y/o portadores, si se desea emulsionantes, surfactantes y dispersantes, conservantes, agentes antiespumantes, agentes anticongelación, para formulación de tratamiento de semilla también opcionalmente colorantes y/o ligantes y/o agentes gelificantes.

[0099] Ejemplos de solventes adecuados son agua, solventes aromáticos (por ejemplo productos de Solvesso, xileno), parafinas (por ejemplo fracciones de aceite mineral), alcoholes (por ejemplo metanol, butanol, pentanol, alcohol bencílico), cetonas (por ejemplo ciclohexanona, gamma-butirolactona), pirrolidonas (NMP, NOP) acetatos (glicol diacetato), glicoles, dietilamidas de ácido graso, ácidos grasos y ésteres de ácido graso. En principio, mezclas solventes también se pueden usar.

[0100] Ejemplos de portadores adecuados son minerales naturales molidos (por ejemplo caolines, arcillas, talco yeso) y minerales sintéticos molidos (por ejemplo sílice altamente dispersa, silicatos). Emulsionantes adecuados son emulsionantes no iónicos y aniónicos (por ejemplo éteres de alcohol graso de polioxietileno, alquilsulfonatos y arilsulfonatos).

[0101] Ejemplos de dispersantes son soluciones de residuos lignina-sulfito y metilcelulosa.

[0102] Surfactantes adecuados usados son metal alcalino, metal alcalinotérreo y sales amónicas de ácido lignosulfónico, ácido naftalenesulfónico, ácido fenolsulfónico, ácido dibutilnaftalenesulfónico, alquilarilsulfonatos, alquil sulfatos, alquilsulfonatos, sulfatos de alcohol graso, ácidos grasos y éteres de glicol de alcohol graso sulfatado, además condensados de naftaleno sulfonatado y derivados de naftaleno con formaldehído, condensados de naftaleno o de ácido naftalenesulfónico con fenol y formaldehído, éter de octilfenol de polioxietileno, isooctilfenol etoxilado, octilfenol, nonilfenol, alquilfenol poliglicol éteres, tributilfenilo poliglicol éter, tristearilfenil poliglicol éter, alcoholes de poliéter de alquilaril, condensados óxido de alcohol y de etileno de alcohol graso, aceite de ricino etoxilado, éteres de alquilo de polioxietileno, polioxipropileno etoxilado, lauril alcohol poliglicol éter acetal, ésteres de sorbitol, soluciones de residuos de lignosulfito y metilcelulosa.

- [0103] Sustancias que son adecuadas para la preparación de soluciones directamente pulverizables, emulsiones, pastas o dispersiones de aceite son fracciones de aceite mineral de punto de ebullición de medio a alto, tales como queroseno o gasóleo, además aceites de alquitrán de carbón y aceites de origen vegetal o animal, hidrocarburos alifáticos, cíclicos y aromáticos, por ejemplo tolueno, xileno, parafina, tetrahidronaftaleno, naftalenos alquilados o sus derivados, metanol, etanol, propanol, butanol, ciclohexanol, ciclohexanona, isoforona, solventes altamente polares, por ejemplo dimetilsulfóxido, N-metilpirrolidona o agua.
- [0104] También agentes anti-congelación tales como glicerina, etilenglicol, propilenglicol y bactericidas tales se pueden añadir a la formulación. Agentes antiespumantes adecuados son por ejemplo agentes antiespumantes basados en silicona o estearato de magnesio.
- [0105] Conservantes adecuados son por ejemplo diclorofeno y enzilalcoholhemiformal. Formulaciones de tratamiento de semilla de girasol pueden adicionalmente comprender ligantes y opcionalmente colorantes. Los ligantes se pueden añadir para mejorar la adhesión de los materiales activos en las semillas después del tratamiento. Ligantes adecuados son surfactantes de copolímeros EO/PO en bloque pero también polivinilalcoholes, polivinilpirrolidonas, poliácridatos, polimetacrilatos, polibutenos, poliisobutilenos, poliestireno, polietileneaminas, polietileneamidas, polietilenoiminas (Lupasol®; Polymix®), poli éteres, poliuretanos, polivinilacetato, tilosa y copolímeros derivados de estos polímeros.
- [0106] Opcionalmente, colorantes se pueden incluir en la formulación. Colorantes adecuados o colorantes para formulaciones de tratamiento de semilla son rodamina B, C.I. pigmento rojo 112, C.I. solvente rojo 1, pigmento azul 15:4, pigmento azul 15:3, pigmento azul 15:2, pigmento azul 15:1, pigmento azul 80, pigmento amarillo 1, pigmento amarillo 13, pigmento rojo 112, pigmento rojo 48:2, pigmento rojo 48:1, pigmento rojo 57:1, pigmento rojo 53: 1, pigmento naranja 43, pigmento naranja 34, pigmento naranja 5, pigmento verde 36, pigmento verde 7, pigmento blanco 6, pigmento marrón 25, violeta básico 10, violeta básico 49, rojo ácido 51, rojo ácido 52, rojo ácido 14, azul ácido 9, amarillo ácido 23, rojo básico 10, rojo básico 108.
- [0107] Un ejemplo de un agente gelificante adecuado es carragenina (Satiagel®). Polvos, materiales para extensión, y productos polvables se pueden preparar mediante la mezcla o trituración de forma concomitante de las sustancias activas con un portador sólido. Gránulos, por ejemplo gránulos recubiertos, gránulos impregnados y gránulos homogéneos, se pueden preparar por unión de los compuestos activos a portadores sólidos. Ejemplos de portadores sólidos son suelos minerales tales como geles de sílice, silicatos, talco, caolín, atapulgita, piedra caliza, cal, yeso, bole, loes, arcilla, dolomita, tierra diatomácea, sulfato de calcio, sulfato de magnesio, óxido de magnesio, materiales sintéticos molidos, fertilizantes, tales como, por ejemplo, sulfato de amonio, fosfato de amonio, nitrato de amonio, ureas y productos de origen de vegetal, tales como harina de cereales, harina de corteza de árbol, harina de madera y harina de cáscara de nuez, polvos de celulosa y otros portadores sólidos.
- [0108] En general, las formulaciones comprenden de 0,01 a 95% en peso, preferiblemente de 0,1 a 90% en peso, del herbicida inhibidor de AHAS. En este caso, los herbicidas inhibidores de AHAS se emplean en una pureza de 90% a 100% en peso, preferiblemente de 95% a 100% en peso (según el espectro NIVIR). Para fines de tratamiento de semillas de girasol, formulaciones respectivas se pueden diluir de 2-10 veces llevando a concentraciones en preparaciones listas para su uso de 0,01 a 60% de compuesto activo en peso por peso, preferiblemente de 0,1 a 40% en peso.
- [0109] El herbicida inhibidor de AHAS se puede usar como tal, en forma de sus formulaciones o usar formas preparadas a partir de éste, por ejemplo en forma de soluciones directamente pulverizables, polvos, suspensiones o dispersiones, emulsiones, dispersiones de aceite, pastas, productos polvables, materiales para extensión, o gránulos, mediante pulverización, atomización, espolvoreo, extensión o vertido. El uso de formas depende en su totalidad de los fines destinados; se desea garantizar en cada caso la distribución más fina posible del herbicida inhibidor de AHAS según la presente invención.
- [0110] El uso de formas acuosas se puede obtener a partir de concentrados de emulsión, pastas o polvos humedecibles (polverizables, dispersiones de aceite) añadiendo agua. Para preparar emulsiones, pastas o dispersiones de aceite, las sustancias, como tales o disueltas en un aceite o solvente, se pueden homogeneizar en el agua mediante un humectante, adherente, dispersante o emulsionante. Sin embargo, también es posible preparar concentrados compuestos por sustancia activa, humectante, adherente, dispersante o emulsionante y, si es apropiado, solvente o aceite, y tales concentrados son adecuados para dilución con agua.
- [0111] Las concentraciones de compuesto activo en las preparaciones listas para su uso se pueden variar dentro de gamas relativamente amplias. En general, ellos van de 0,0001 a 10%, preferiblemente de 0,01 a 1% por peso.
- [0112] En una forma de realización de la presente invención, otro sujeto de la presente invención es un método de tratamiento de tierra mediante la aplicación, en particular en la sembradora: bien de una formulación granulosa que contiene el herbicida inhibidor de AHAS como una composición/formulación (por ejemplo, una formulación granulosa, con opcionalmente uno o varios sólidos o líquidos, portadores aceptables agrícolas y/o opcionalmente con uno o varios surfactantes aceptables agrícolas. Este método es ventajosamente empleado en semilleros de girasoles.

[0113] Formas de realización de la presente invención también describen semillas de girasol recubiertas con y/o que contienen una formulación de tratamiento de semilla que comprende al menos un herbicida inhibidor de AHAS seleccionado del grupo que consiste en amidosulfurón, azimsulfurón, bensulfurón, chlorimurón, clorsulfurón, cinosulfurón, ciclosulfamurón, etametsulfurón, etoxisulfurón, flazasulfurón, flupirsulfurón, foramsulfurón, halosulfurón, imazosulfurón, iodosulfurón, mesosulfurón, metsulfurón, nicosulfurón, oxasulfurón, primisulfurón, prosulfurón, pirazosulfurón, rimsulfurón, sulfometurón, sulfosulfurón, tifensulfurón, triasulfurón, tribenurón, trifloxisulfurón, triflusulfurón, tritosulfurón, imazametabenzox, imazamox, imazapic, imazapir, imazaquin, imazetapir, cloransulam, diclosulam, florasulam, flumetsulam, metosulam, penoxsulam, bispiribac, piriminobac, propoxycarbazona, flucarbazona, piribenzoxim, piriflitalid y piritiobac.

[0114] El término semilla abarca semillas y propágulos vegetales de cualquier tipo, incluyendo pero no limitado a, semillas reales, piezas de semilla, brotes, cormos, bulbos, fruta, tubérculos, granos, recortes, brotes de corte y similares y se refiere, en una forma de realización preferida, a semillas reales.

[0115] El término “recubierto con y/o que contiene” generalmente significa que la sustancia activa está en su mayor parte en la superficie del producto de propagación cuando se aplica, aunque una parte superior o inferior del ingrediente puede penetrar en el producto de propagación, dependiendo del método de aplicación. Cuando el producto de propagación es (re)plantado, puede absorber la sustancia activa.

[0116] La aplicación de tratamiento a la semilla de girasol con el herbicida inhibidor de AHAS o con una formulación que comprende el herbicida inhibidor de AHAS se realiza pulverizando o espolvoreando las semillas antes de la siembra de las plantas y antes de la emergencia de las plantas.

[0117] En el tratamiento de semillas de girasol, las formulaciones correspondientes se aplican por tratamiento de las semillas con una cantidad eficaz del herbicida inhibidor de AHAS o una formulación que comprende el herbicida inhibidor de AHAS.

Aquí, los índices de aplicación son generalmente de 0,1 g a 10 kg del ingrediente activo (“a.i.”) (o de la mezcla de a.i. o de la formulación) por 100 kg de semilla, preferiblemente de 1 g a 5 kg por 100 kg de semilla, en particular de 1 g a 2,5 kg por 100 kg de semilla.

[0118] También se describe lo siguiente:

1. Una planta de girasol que tiene resistencia a un herbicida de imidazolinona, un herbicida de sulfonilurea, un herbicida de triazolopirimidina, un herbicida de pirimidiniloxibenzoato y sus mezclas derivadas, donde el contenido de aceite de la semilla de dicha planta es mayor de 40%.

2. Una planta de girasol que tiene resistencia para un herbicida de imidazolinona, un herbicida de sulfonilurea, un herbicida de triazolopirimidina, un herbicida de pirimidiniloxibenzoato y sus mezclas derivadas, donde el rendimiento de semilla de dicha planta es de más de una tonelada por hectárea.

3. Una planta de girasol que tiene resistencia a un herbicida de imidazolinona, un herbicida de sulfonilurea, un herbicida de triazolopirimidina, un herbicida de pirimidiniloxibenzoato, y sus mezclas derivadas, donde dicha planta de girasol tiene una cabeza única.

4. La planta de girasol según la forma de realización 1 o la forma de realización 3, donde dicha planta de girasol produce más de una tonelada de semilla por hectárea.

5. La planta de girasol según la forma de realización 1 o forma de realización 2, donde la planta de girasol tiene una cabeza única.

6. La planta de girasol según la forma de realización 2 o la forma de realización 3, donde el contenido de aceite de la semilla de dicha planta de girasol es mayor de 40%.

7. La planta de girasol de la forma de realización 1, donde dicha planta de girasol produce más de una tonelada de semilla por hectárea, y donde dicha planta tiene una cabeza única.

8. La planta de girasol según cualquiera de las formas de realización 1-7, donde dicha planta de girasol comprende un gen AHAS mutante, donde dicho gen mutante codifica una mutación en el aminoácido 574 o su equivalente, donde el aminoácido 574 o su equivalente es un aminoácido diferente del triptófano.

9. La planta de girasol de la forma de realización 8, donde el aminoácido 574 o su equivalente es leucina.

10. La planta de girasol según cualquiera de las formas de realización 1-7, dicha planta de girasol tiene un gen *AHASL1* con la secuencia de nucleótidos expuesta en SEC ID n.º: 1.

11. La planta de girasol según cualquiera de las formas de realización 1-7, dicha planta de girasol produce una proteína *AHASL1* que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en SEC ID n.º: 2.

12. Un ácido nucleico aislado que comprende SEC ID n.º: 1

13. Una célula vegetal de girasol transformada de forma estable con un ácido nucleico que tiene la secuencia de SEC ID n.º: 1.

14. Una planta de girasol transgénico, donde dicha planta comprende un transgén que comprende SEC ID n.º: 1.

15. Un casete de expresión que comprende un activo promotor en plantas de girasol operativamente enlazado a un ácido nucleico aislado que codifica una proteína que comprende la secuencia codificada por SEC ID n.º: 1.

16. Un método para controlar hierbas en la proximidad de una planta de girasol que comprende la aplicación de un herbicida a los hierbajos y a la planta de girasol, donde el herbicida se selecciona del grupo que consiste en un herbicida de imidazolinona, un herbicida de sulfonilurea, un herbicida de triazolopirimidina, un

herbicida de pirimidiniloxibenzoato y sus mezclas derivadas,

donde la planta de girasol es una planta según cualquiera de las formas de realización 1-9 o 11-12.

17. Una semilla de girasol, donde la planta crecida a partir de dicha semilla tiene resistencia a un herbicida de imidazolinona, un herbicida de sulfonilurea, un herbicida de triazolopirimidina, un herbicida de pirimidiniloxibenzoato y sus mezclas derivadas, y donde el contenido de aceite de la semilla de dicha planta es mayor de 40%.

18. Una semilla de girasol, donde la planta crecida de dicha semilla tiene resistencia a un herbicida de imidazolinona, un herbicida de sulfonilurea, un herbicida de triazolopirimidina, un herbicida de pirimidiniloxibenzoato y sus mezclas derivadas, y donde el rendimiento de semilla de dicha planta es más de una tonelada por hectárea.

19. Una semilla de girasol, donde la planta crecida a partir de dicha semilla tiene resistencia a un herbicida de imidazolinona, un herbicida de sulfonilurea, un herbicida de triazolopirimidina, un herbicida de pirimidiniloxibenzoato, y sus mezclas derivadas, y donde dicha planta de girasol tiene una cabeza única.

20. La semilla de girasol según la forma de realización 17 o la forma de realización 19, donde dicha planta de girasol crecida a partir de dicha semilla produce más de una tonelada de semilla por hectárea.

21. La semilla de girasol según la forma de realización 17 o la forma de realización 18, donde la planta de girasol crecida a partir de dicha semilla tiene una cabeza única.

22. La semilla de girasol según la forma de realización 18 o la forma de realización 19, donde el contenido de aceite de la semilla de dicha semilla es mayor de 40%.

23. La semilla de girasol de la forma de realización 17, donde la planta de girasol crecida a partir de dicha semilla produce más de una tonelada de semilla por hectárea, y donde dicha planta tiene una cabeza única.

24. La semilla de girasol según cualquier de las formas de realización 17-23, dicha planta de girasol tiene un gen *AHASL1* con la secuencia de nucleótidos expuesta en SEC ID n.º: 1.

25. La planta de girasol según cualquier de las formas de realización 17-23, dicha planta de girasol produce una proteína *AHASL1* que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en SEC ID n.º: 2.

26. La semilla de girasol según cualquiera de las formas de realización 17-23, donde dicha semilla de girasol comprende un gen *AHAS* mutante, donde dicho gen mutante codifica una mutación en el aminoácido 574 o su equivalente, donde el aminoácido 574 o su equivalente es un aminoácido diferente del triptófano.

27. La semilla de girasol de la forma de realización 26, donde el aminoácido 574 o su equivalente es leucina.

28. Un método para controlar selectivamente hierbajos en un campo que contiene semillas de girasol plantada o plantas que comprenden:

plantar una semilla de girasol según cualquiera de las formas de realización 17-23 o 26-27, y aplicar una cantidad suficiente de un herbicida para controlar los hierbajos, donde dicho herbicida se selecciona del grupo que consiste en una sulfonilurea, una imidazolinona, unos pirimidiniloxibenzoatos, una triazolopirimidina y sus mezclas derivadas.

29. Un método de mejora de la tolerancia al herbicida en una planta de girasol que comprende: transformar una célula de girasol con un constructo que comprende una secuencia de ácidos nucleicos que codifica la proteína codificada por SEC ID n.º: 1, regenerar la célula de girasol en una planta de girasol; y

seleccionar plantas de flor fértil que sean vegetativas y reproductivas resistentes a una dosis efectiva de herbicida, donde el herbicida se selecciona del grupo que consiste en una sulfonilurea, una imidazolinona, unos pirimidiniloxibenzoatos, una triazolopirimidina y sus mezclas derivadas.

30. Un método para producir una planta de girasol resistente al herbicida que comprende: cruzar una primera planta de girasol que tiene actividad de AHAS resistente al herbicida con una segunda planta de girasol que no tiene actividad de AHAS resistente al herbicida, donde dicha primera planta de girasol comprende un ácido nucleico que codifica la proteína codificada por SEC ID n.º: 1.

31. El método de la forma de realización 30, que comprende además la selección para una planta descendiente que tiene actividad de AHAS resistente al herbicida.

32. Una semilla de una planta de girasol producida por el método de la forma de realización 30, donde la semilla comprende las características resistentes al herbicida de la primera planta de girasol.

33. Una semilla de cultivo de girasol designada RW-B, una semilla representativa de dicho cultivo de girasol que se ha depositado bajo el número de acceso de la ATCC: PTA-9176.

34. Una planta de girasol, o una parte de la misma, producido por crecimiento de la semilla de la forma de realización 33.

35. Polen de la planta de la forma de realización 34.

36. Un óvulo de la planta de la forma de realización 34.

37. Una planta de girasol, o una parte de la misma, que tiene todas las características fisiológicas, resistentes a los herbicidas y morfológicas de la planta según la forma de realización 34.

38. Semillas de la planta de la forma de realización 37, donde plantas producidas por crecimiento de las semillas tienen todas las características fisiológicas y morfológicas de las plantas producidas por semillas en crecimiento depositadas bajo el número de acceso de la ATCC: PTA-9176.

39. Un cultivo de tejido de células regenerables de la planta de girasol según la forma de realización 34.

40. El cultivo de tejido según la forma de realización 39, donde las células del cultivo de tejido comprenden una hoja, polen, un embrión, un cotiledón, un hipocotilo, células meristemáticas, una raíz, una punta de raíz, una antera, una flor, una semilla, un vástago, óvulos, brotes, tallos, varillas, cápsula de mesocarpio o una vaina.

41. Una planta de girasol generada a partir del cultivo de tejido de la forma de realización 40.

42. Una planta de girasol generada a partir del cultivo del tejido de la forma de realización 40, donde la planta regenerada es capaz de expresar todas las características morfológicas y fisiológicas del cultivo de girasol RW-B, la semilla representativa del cultivo de girasol RW-B que se ha depositado bajo el número de acceso de la ATCC: PTA-9176.

43. Un método para producir una semilla de girasol que comprende:

cruzar una primera planta de girasol original con una segunda planta de girasol original, y recoger la semilla de girasol de la primera generación resultante, donde la primera o la segunda planta de girasol original es una planta de girasol según la forma de realización 34 o una planta de girasol que tiene todas las características fisiológicas y morfológicas de una planta según la forma de realización 37.

44. Un método para producir una planta de girasol derivado de RW-B, que comprende:

cruzar la línea de girasol RW-B, semilla representativa del cultivo de girasol RW-B que se ha depositado bajo número de acceso de la ATCC:

PTA-9176, con una segunda planta de girasol para producir semilla de girasol descendiente; y

cultivar la descendiente para producir la planta de girasol derivado de RW-B.

45. Un cultivo de tejido de células regenerables de la planta de girasol según la forma de realización 37.

46. El cultivo de tejido según la forma de realización 45, donde las células del cultivo de tejido son de una hoja, polen, un embrión, un cotiledón, un hipocotilo, células meristemáticas, una raíz, una punta de raíz, un antera, una flor, una semilla, un vástago, óvulos, brotes, tallos, varillas, cápsula de mesocarpio o una vaina.

47. Una planta de girasol generada a partir del cultivo de tejido de la forma de realización 45.

48. Una planta de girasol generada a partir del cultivo del tejido de la forma de realización 45, donde la planta regenerada es capaz de expresar todas las características morfológicas y fisiológicas del cultivo de girasol RW-B, la semilla representativa del cultivo de girasol RW-B que se ha depositado bajo el número de acceso de ATCC: PTA-9176.

[0119] Los siguientes ejemplos se ofrecen a modo de ilustración y no a modo de limitación.

Identificación de plantas resistentes

[0120] 300 semillas de una población de girasol salvaje conocida por ser tolerante a IMIs se sembraron bajo condiciones de invernadero en la Nidera Experimental Station en Venado Tuerto, Santa Fe, Argentina, con las líneas de control HA89; B770 (Susceptible - "S"), BTI-M1 y RHA426 (Resistente - "R"). En la fase V4 todas las plantas fueron pulverizadas con imazapir a razón de 80 gr ai/ha. Dos semanas después del tratamiento, todas las plantas fueron evaluadas por inspección visual para daño. Las líneas S HA89 y B770 fueron matadas por el tratamiento. La línea R RHA426 mostró signos de clorosis y la línea R BTI-M1 1 no presentó ninguna señal de daño. En total, 159 Plantas de la población salvaje resistió el tratamiento herbicida y 129 fueron matadas (categorizadas como S). Además, 18 de las 159 plantas que sobrevivieron al tratamiento herbicida no mostraron ninguno de los síntomas de daño por herbicida, similar a la línea mutante R BTI-M 1, y fueron categorizadas como R.

Genética de resistencia

[0121] Un planta R (RW-73) se usó como macho en cruces con las líneas susceptibles cultivadas HA89 y B770. Diez de las 20 plantas F₁ de cada cruce fueron pulverizadas con imazapir a razón de 80 gr ai/ha, usando B770 (S) y BTI-M1 (R) como controles. Ninguna de las plantas F₁ mostró síntomas de daño por herbicida, lo que fue similar a las plantas BTI-M1. Sin embargo, el tratamiento de imazapir mató las plantas B770.

[0122] Un F₁ planta del cruce HA89/RW-73 fue retrocruzada con el original susceptible. También, una planta del cruce B770/RW-73 fue retrocruzada con B770. Semillas F₂ fueron obtenidas por polinización de plantas F₁ entre ellas.

[0123] Las semillas BC 1 F 1 y F₂ obtenidas fueron sembradas bajo condiciones de invernadero junto con B770 y BTI-M1, usados como controles susceptibles y resistentes, respectivamente. En la fase V3-V4 todas las plantas fueron pulverizadas con imazapir a razón de 80 gr ai/ha. Las plantas fueron marcadas 14 días después del tratamiento como R, S o I (intermedio). Las plantas fueron categorizadas como R si no mostraron ningún daño por herbicida, S si murieron o I si mostraron reducción de altura o clorosis. Los resultados de la herencia de resistencia a imidazolinona en RW-73 se muestran en la tabla 1 mostrada en la FIG. 3.

[0124] En particular, la Tabla 1 muestra la respuesta de las plantas de girasol [resistente (R), intermedio (I), susceptible (S)] a imazapir aplicado a razón de 80 g a.i.ha⁻¹ en poblaciones F₁, F₂ y BC₁F₁ resultantes de cruces entre la línea resistente, RW-73, y uno de las dos líneas susceptibles, B770 y HA89, y las pruebas de chi-cuadrado de modelo de locus único para control de resistencia.

[0125] Las poblaciones F₂ resultantes a partir de cruces de susceptibles con resistentes mostró un buen ajuste para una proporción 1:2:1 R:I:S, indicando segregación de un gen único para resistencia a imazapir. Para confirmar estos resultados de las poblaciones F₂, plantas F₁ se cruzaron en pruebas con los originales susceptibles y los descendientes resultantes fueron evaluados para reacción a imazapir. Las poblaciones BC₁F₁ dieron un buen ajuste para una proporción 1:1 I:S, confirmando la hipótesis del locus único (Tabla 1).

[0126] Los resultados del estudio genético indican que la resistencia en RW-73 se hereda como una característica parcialmente dominante conferida por un gen único codificado nuclear. Este modelo de herencia es compatible con otras conclusiones que han proporcionado el control genético de resistencia a los herbicidas inhibidores de AHAS.

5 Desarrollo de una línea de girasol que es homocigótica para la característica de resistencia al herbicida de RW-73

[0127] La condición heterogénea y heterocigota de la población de girasol salvaje analizada anteriormente excluye su uso en el relativo nivel de comparaciones de resistencia con respecto a las líneas cultivadas que portan características de resistencia a los herbicidas. Usando el retrocruce asistido por marcador, una línea resistente cercanamente parecida a B770 fue desarrollada y fue codificada RW-B. RW-B era homocigótica para el gen de resistencia dado que su descendiente obtenido por autofecundación no segregó para susceptibilidad después la aplicación de imazapir.

Resistencia de RW-B a diferentes herbicidas inhibidores de AHAS

15 [0128] Líneas de girasol: las siguientes líneas de girasol genético fueron usadas en la determinación de la resistencia a AHAS: dos líneas S ("B770" y "HA89"), dos líneas resistentes a SUs derivadas de la población SURES (SuBL y SuRL), dos líneas resistentes a IMIs derivadas de la población IMISUN ("Rha 426" y "B770imi") y la línea "RW-B". HA89 y Rha426 son líneas innatas públicas liberadas por el USDA. SURES e IMISUN son poblaciones de cultivo liberadas por el USDA. B770 es una línea exclusiva de Nidera. B770imi es una línea exclusiva con antecedentes B770 que llevan el gen resistente *Imr1*. RW-B se obtuvo como se ha descrito anteriormente.

[0129] Método: ocho semillas de cada una de las siete líneas fueron sembradas en vasijas de 20 por 20 por 30 cm. Después de la emergencia, las plántulas se adelgazaron a mano dejando 4 plántulas por vasija. Cinco vasijas de cada línea fueron tratadas con un herbicida diferente o dosis. Una vasija de control no tratada de cada línea fue incluida en cada experimento. Las plantas se cultivaron en un invernadero bajo condiciones de luz natural suplementadas con lámparas halógenas de 400 W para proporcionar un día de 14 h de duración. Temperaturas de día/de noche fueron 25 y 20°C, respectivamente. En la fase V4 de desarrollo (Schneider and Miller 1981) las plantas fueron pulverizadas con tres herbicidas SU (clorsulfurón, nicosulfurón y foramsulfurón), tres IMIs (Imazamox, imazapir e imazapic), un POB (Bispiribac-Na) y un TP (Cloransulam-metil). Catorce días después del tratamiento las plantas fueron marcadas fenotípicamente utilizando un índice de fitotoxicidad (PI). El PI es una escala fenotípica de 0 a 9 que fue evaluada para cada vasija por inspección visual. Las plantas sin ningún síntoma fueron registradas como "0", el aumento en los niveles de retraso en el crecimiento y amarilleo con respecto a las plantas de control no tratadas se registraron como "1" a "4", niveles en aumento de anomalías en las hojas y necrosis en las hojas fueron registrados de "5" a "8" y las plantas muertas con necrosis total del ápice fueron registradas como "9". Los datos del PI para cada experimento fueron analizados por una prueba ANOVA, fueron comparados por una prueba LSD.

[0130] Los resultados se muestran en la Tabla 2 de la figura 4, que muestra el índice de fitotoxicidad de siete líneas de girasol pulverizadas con herbicidas inhibidores de AHAS diferentes; Tabla 2. Respuesta de líneas de girasol (B770; HA89, SuBL, SuRL, Rha426, B770imi y RW-B) a cuatro familias diferentes de herbicidas inhibidores de AHAS. Los datos MS entre las líneas significan suma cuadrado, *** $P < 0,001$, menor valor de diferencia significativa LSD. Valores medios con la misma letra indican que no son estadísticamente diferente ($P < 0,01$). El daño fue medido utilizando el índice de fitotoxicidad (PI).

[0131] El líneas S HA89 y B770 fueron matadas por todas las aplicaciones de herbicidas. Las líneas resistentes al SU SuBL y SuRL fueron resistentes a los tres SUs usados, pero fueron matadas por todos los demás herbicidas. Las líneas resistentes a IMI Rha426 y B770imi fueron moderadamente resistentes a los tres IMIs y fueron altamente susceptibles al SUs, el POB y el TP. Notablemente, RW-B, mostró niveles altos de resistencia a las cuatro familias de herbicidas. Sorprendentemente, la línea RW-B mostró lo mismo nivel de resistencia a SUs que las líneas resistentes al SU SuBL y SuRL y un mejor nivel de resistencia a IMIs que las líneas resistentes a IMI Rha426 y B770imi. Además, en otro resultado sorprendente, RW-B mostró un nivel alto de resistencia a un POB y un TP. Ningunas de las otras líneas mostró este tipo de resistencia.

Prueba de alelismo

55 [0132] Plantas RW-B fueron cruzadas con RHA426 para determinar si el gen resistente en RW-B es alélico a *Imr1*, la mutación previamente descrita en líneas innatas resistentes a la imidazolinona. En este cruce, plantas de híbridos F_1 fueron autopolinizadas y retrocruzadas con RHA426 para obtener las generaciones F_2 y BC_1F_1 , respectivamente. Plantas de los originales y de F_1 , F_2 y BC_1F_1 fueron inoculadas con 160 g a.i. ha^{-1} y 320 g a.i. ha^{-1} de imazapir en la fase V2-V4. Tras la inoculación, las plantas fueron marcadas como se ha descrito anteriormente. Ningunas de las plantas susceptibles se observaron en las poblaciones F_2 y BC_1F_1 resultantes de este cruce cuando se evaluaron los descendientes en el índice de herbicida inferior, indicando que los genes de resistencia en RW-B y RHA426 son alelos del mismo locus. Estos resultados se muestran en la Tabla 3 de la figura 5. En particular, la Tabla 3 muestra la respuesta de las plantas de girasol (es decir, como resistente (R) y susceptible (S)) a imazapir aplicado a índices de 80 g a.i. ha^{-1} y 320 g a.i. ha^{-1} en generaciones F_1 , F_2 y BC_1F_1 resultantes de cruces entre RW-B y la línea pura que lleva el gen de resistencia a la imidazolinona *Imr1*, RHA 426.

[0133] Por otro lado, cuando las poblaciones F_2 y BC_1F_1 se marcaron después de aplicar el herbicida en el índice más alto (320 g a.i. ha^{-1}), la segregación para susceptibilidad se pudo observar. Solo dos clases fenotípicas fueron detectadas, una clase resistente compuesta por plantas no tuvieron signo de daño o sólo pequeños síntomas, y un fenotipo susceptible que fue matado en esta dosis de forma similar a la línea de control RHA426. Las proporciones de segregación observadas sobre 508 plantas F_2 seleccionadas no fueron significativamente diferentes de una proporción de segregación 3:1 (véase tabla 3). Para confirmar estos resultados, las plantas F_1 fueron retrocruzadas con RHA426 y las plantas BC_1F_1 resultantes fueron seleccionadas en 320 g a.i. ha^{-1} de imazapir. Las proporciones de segregación observadas dieron un buen ajuste a una proporción 1:1 R:S, confirmando que el gen resistente en RW-B mostró dominación completa sobre el gen resistente en RHA426, y que ambos genes resistentes son alelos del mismo locus, *AHAS1*.

Cosegregación de haplotipo *AHAS1* con resistencia al herbicida

[0134] Materiales y métodos: ADN fue aislado a partir de hojas jóvenes de las líneas B770, RW-B y RHA426 al igual que de plantas individuales F_1 y F_2 del cruce RW-B/RHA426 utilizando el método de Dellaporta (1983). Fragmentos del gen *AHAS1* fueron amplificados por PCR utilizando los cebadores p-*AHAS18* y p-*AHAS19* (Kolkman *et al.*, 2004). Productos de PCR fueron amplificados en una reacción de 15- μ l que contenía 1 U Taq de ADN polimerasa (Biotools), 70 ng de ADN de girasol genómico, 25 μ g de albúmina de suero bovino (BSA), con una concentración final de 100 μ M de cada dNTP, 0,25 μ M de cada cebador, 90 mM Tris-HCl pH 8, 20 mM $(NH_4)_2SO_4$ y 2,5 mM $MgCl_2$. El programa de PCR consistió en un paso de desnaturalización inicial a 94°C durante 2 min, seguido de 40 ciclos de 30 s a 94°C, 30 s a 56°C y 30 s a 72°C, seguidos de un paso de alargamiento final a 72°C durante 10 min. Los productos de amplificación (3 μ l/vía) fueron separados en un gel de secuenciación estándar que contenía 6% de poliacrilamida, 8 M de urea y 1X TBE, a una potencia constante de 60 W durante 2 a 3 h, y fueron detectados por coloración de nitrato de plata (Silver Sequence™ Promega Biotech, EE.UU.). El tamaño de cada alelo SSR fue estimado utilizando un marcador de peso molecular y una reacción de secuenciación estándar en vías adyacentes del gel.

[0135] Resultados: el gen *AHAS1* en el girasol presenta un polimorfismo de repetición de secuencia simple (SSR) que permite la discriminación de las líneas que portan el alelo *Imr1* a partir de cualquier otro genotipo de girasol (Kolkman *et al.*, 2004). La amplificación por PCR del fragmento del gen *AHAS1* que contiene esta SSR utilizando los cebadores p-*AHAS18* y p-*AHAS19* liberó un producto de 321 pares de bases para RW-B y un fragmento de 312 pares de bases para RHA426. Este polimorfismo variante en longitud detectado en RW-B y RHA426 fue aprovechado para investigar la segregación en las poblaciones F_2 y BC_1F_1 derivadas de cruzamiento de ambas líneas. Ciento once plantas de la población F_2 y 126 plantas de la población BC_1F_1 fueron elegidas al azar, muestreadas para aislamiento de ADN, inoculadas con un índice de aplicación de imazapir de 320 g a.i. ha^{-1} y genotipadas usando este marcador. En la población F_2 , 30 plantas fueron matadas por el herbicida (S) y 81 no mostraron ningún síntoma o daño ligero (R). Estos datos se muestran en la tabla 4. En particular, la Tabla 4 muestra la reacción de las plantas de girasol (es decir, como resistente (R) y susceptible (S)) a imazapir aplicado a un índice de 320 g a.i. ha^{-1} y segregación de haplotipo *AHAS1* (A = haplotipo RW-B, B = haplotipo RHA426) en la población F_2 y BC_1F_1 derivada del cruce RW-B / RHA426.

[0136] La proporción de segregación observada para resistencia no fue significativamente diferente de la proporción de segregación esperada para un factor completamente dominante segregando en F_2 (3R: 1 S). La segregación observada para el marcador SSR de *AHAS1* (26 A/A: 55 A/B: 30 B/B) establece una proporción de segregación prevista para un marcador codominante segregando en F_2 (1:2:1). Todas las plantas susceptibles genotipadas para el SSR de *AHAS1* fueron homocigóticas para el haplotipo RHA426 (B/B), mientras que las plantas R fueron bien heterocigóticas (A/B) u homocigóticas para el haplotipo RW-B (A/A) (véase tabla 4). La cosegregación de fenotipos de resistencia al herbicida y haplotipos *AHAS1* fue además evaluada en 126 descendientes de BC_1F_1 segregando para resistencia. Proporciones de segregación observadas para resistencia establecen una proporción 1:1 como la prevista para la segregación de un locus en BC_1F_1 . Los haplotipos SSR de *AHAS1* cosegregaron completamente con fenotipos para reacción al herbicida, 64 A/B: 62 BB. Los descendientes susceptibles fueron homocigóticos para el haplotipo RHA426 (B/B), mientras que los descendientes resistentes fueron heterocigóticos para los haplotipos RHA426 y RW-B (A/B). Estos resultados confirman que el gen resistente en RW-B es diferente del gen de resistencia en RHA426 y que ambos genes son variantes alélicas del locus *AHAS1*.

Amplificación por PCR y secuenciación del gen *AHAS1* de girasol a partir de RW-B

[0137] ADN genómico fue extraído de tejido de hoja de girasol usando el equipo de Qiagen DNeasy 96 Plant (catálogo nº 69181). El gen *AHAS1* fue amplificado por PCR en tres fragmentos y directamente secuenciado por MacroGen EE.UU. La amplificación por PCR fue realizada con Hotstart Taq ADN polimerasa de Qiagen y reactivos asociados (catálogo n.º: 203205). Los cebadores de PCR para los tres fragmentos son de la siguiente manera: *AHAS1F1* (cebador sentido 1-19 pares de bases de la secuencia pública de girasol AY541451) 5'ATGGCGGCTCCTCCCAACC3', *AHAS1R1* (cebador antisentido 757-777 pares de bases de la secuencia pública de girasol AY541451) 5'CGGTAACCTCATCGGTTTCATC3', *AHAS1F2* (cebador sentido 757-777 pares de bases de la secuencia pública de girasol AY541451) 5'GATGAACCGATGAGGTTACCG3', *AHAS1R2* (cebador antisentido 1794-1814 pares de bases de la secuencia pública de girasol AY541451) 5'TCCGCCTTTTGGGTCACTCGA3', *AHAS1F3* (cebador sentido 1248-1269 pares de bases de la secuencia pública de girasol AY541451) 5'GGTGACTAATCTTGATTTTTCG3' y *AHAS1R3* (cebador antisentido 1949-1968 pares de bases de la secuencia pública de girasol AY541451)

5'TCAATATTTTCGTTCTGCCAT3'.

[0138] Los tres fragmentos de PCR cubren todos los sitios de mutación conocidos por conferir resistencia a los herbicidas IMI. Una alineación de nucleótidos fue producida y los cromatogramas resultantes examinados para polimorfismos entre la línea susceptible B770 y la línea resistente RW-B.

Resultados de la secuenciación del gen *AHASL1* de girasol

[0139] Productos de PCR fueron secuenciados para producir las secuencias *AHASL1* para las líneas de girasol RW-B y B770. Una alineación de estas secuencias de nucleótidos y las secuencias de nucleótidos del gen *AHAS* de *Xanthium sp.* (número de acceso del Genbank U16280) se muestran en la figura 1.

[0140] En particular, la figura 1 muestra una alineación de secuencia de ADN parcial de la región codificante del gen *AHASL1* a partir de HA89 (número de acceso del GenBank AY541451) (SEC ID N°: 3), línea B770 (SEC ID n.º: 4), línea resistente RW-B (SEC ID n.º: 5), gen *ALS* de *Xanthium sp.* (número de acceso del GenBank U16280) (SEC ID N°: 6) y gen *AHAS* de *Arabidopsis thaliana* (número de acceso del GenBank AY124092) (SEC ID N°: 7). Los asteriscos señalan la mutación única encontrada en RW-B, este cambio de base es responsable de la sustitución Trp-a-Leu en la posición aminoacídica 574 (basado en la secuencia de *Arabidopsis thaliana*). Las posiciones de secuencia de nucleótidos se indican por flechas y se numeran según la secuencia de *A. thaliana*.

[0141] La alineación reveló que el gen *AHASL1* de RW-B tenía una transición G-a-T con respecto al *AHASL1* de B770.

[0142] Una alineación de las secuencias de aminoácidos predichas de las secuencias de nucleótidos *AHASL1* de RW-B, B770, y *Xanthium sp* se proporciona en la figura 2.

[0143] En particular, la figura 2 muestra una alineación de secuencia de aminoácidos parcial de la proteína *AHASL1* de HA89 (número de acceso del GenBank AY541451) (SEC ID N°: 8), línea B770 (SEC ID n.º: 9), línea resistente RW-B (SEC ID n.º: 10), gen *ALS* de *Xanthium sp.* (número de acceso del GenBank U 16280) (SEC ID N°: 11) y gen *AHAS* de *Arabidopsis thaliana* (número de acceso del GenBank AY124092) (SEC ID N°: 12). El asterisco señala la sustitución de aminoácidos en el codón 574 (basado en la secuencia de *Arabidopsis thaliana*).

[0144] Con respecto a la secuencia de aminoácidos *AHASL1* de B770, la secuencia de aminoácidos *AHASL1* de RW-B tiene una sustitución triptófano-a-leucina en la posición del aminoácido 574 en la secuencia de aminoácidos en toda su longitud codificada por la secuencia de nucleótidos *AHASL* de *Arabidopsis thaliana*. Por esta razón, este nuevo alelo del locus *AHASL1* es nombrado aquí como W574L.

Comparación de las características agronómicas (rendimiento de grano y contenido de aceite) de los híbridos de girasol que portan el alelo W574L con respecto a híbridos convencionales (tipo salvaje) y los que portan el alelo A205V (característica IMISUN)

[0145] Objetivo: este experimento fue llevado a cabo para cuantificar y contrastar el rendimiento agronómico de híbridos que portan el alelo W574L con híbridos convencionales (tipo salvaje) e imisun (alelo A205V).

[0146] Materiales: la línea RW-B fue convertida en una línea estéril macho por retrocruce repetido con una línea estéril macho citoplásmica (cms B770). Después de 4 retrocruces la línea estéril obtenida fue denominada "cms RW-B".

[0147] La línea RW-B fue también usada como una fuente de resistencia al herbicida para convertir dos líneas convencionales restauradoras diferentes (tipo salvaje): R20 y R54. Las obtenidas cerca de líneas isogénicas fueron designadas R20-574 y R54-574.

[0148] Los híbridos F₁ entre líneas convencionales IMISUN y RW-B derivadas fueron obtenidos bajo condiciones de campo. El evento de genealogía y mutación de éstos se muestra en la siguiente tabla.

Tabla 5. Híbrido 4 (cms B770 x R54) e híbrido 6 (cms B770 x IR152) son dos híbridos comerciales registrados conocidos como "Paraíso 33" y "Paraíso 103CL", respectivamente.

Híbrido	Genealogía	Alelo mutante
1	cms RW-B x R20-574	W574L
2	cms RW-B x R54-574	W574L
3	cms B770 x R20	tipo salvaje
4	cms B770 x R54	tipo salvaje
5	cms B770 imi x IR79	A205V

6	cms B770 imi x IR152	A205V
---	----------------------	-------

[0149] Métodos: semillas fueron sembradas bajo condiciones de campo (Venado Tuerto, Santa Fe, Argentina) en un diseño de bloque completamente aleatorizado con cuatro replicaciones. Cada gráfico consistió en tres filas de 6 metros de largo y distanciadas 0,7 m. Las semillas fueron distanciadas 0,30 m en la fila.

[0150] Se registraron las siguientes variables en cada gráfico: días para floración, altura y floración, rendimiento (kg/HA) y porcentaje de aceite en el grano (%). Una prueba anova fue llevada a cabo sobre estas variables y los medios de los eventos diferentes e híbridos fueron comparados con la prueba de Tuckey.

[0151] Resultados: valores medios de cada evento para las 4 variables registradas se dan en la tabla 6. Como se puede observar, los tres eventos tuvieron similares rendimientos medios. El análisis detectó diferencias para contenido de aceite en la semilla entre eventos, ya que los híbridos con el alelo A205V dieron contenido de aceite inferior a los otros dos tipos de híbridos. Días para la floración y altura de la planta fueron también diferente entre eventos, ya que los híbridos que portaban el alelo W574L fueron ligeramente menores y más tempranos que los dos otros tipos de híbridos. En conclusión, los dos híbridos que portan el alelo W574L mostraron el mismo rendimiento y contenido de aceite comparable en la semilla que los híbridos convencionales (tipo salvaje) y de IMISUN, que incluyen variedades híbridas comerciales.

[0152] Medidas de cada híbrido para cada una de las variables registradas, y los resultados del análisis de varianza se dan en la tabla 7.

Tabla 6. Valores medios para Altura, Días para floración (DTF), Rendimiento y Contenido de aceite para 3 genotipos diferentes (eventos de mutación) para el locus *AHASL1*. El valor medio de cada genotipo o evento de mutación es el valor medio de dos híbridos diferentes.

Alelo	Altura (m)	DTF (días)	Rendimiento (kg/ha)	Contenido de aceite (%)
W574L	2,14 ^{al}	63,3 ^a	3062 ^a	45,8 ^a
WT	2,22 ^b	66,4 ^b	3523 ^a	46,3 ^a
A205V	2,17 ^{ab}	65,8 ^b	3119 ^a	44,5 ^b
Media	2,18	65,1	3145	45,6
¹ CV(%)	2,4	0,75	5,39	0,92
² MS	0,015	21,9	76845	6,58
F-valor	5,61	90,5	267	37,3
³ p	<0,015	<0,0001	<0,101	<0,0001
⁴ MSD	0,068	0,64	220,2	0,55
¹ Letras similares indican que no hay diferencias estadísticamente significativas entre eventos. ² CV: coeficiente de variación ³ MS: cuadrado medio entre eventos ⁴ p: valor de probabilidad del valor F ⁵ MSD: diferencia significativa mínima de Tuckey				

Tabla 7. Valores medios para Altura, Días para floración (DTF), Rendimiento y Contenido de aceite para 6 híbridos de girasol que portan tres genotipos diferentes (eventos de mutación) para el locus *AHASL1*.

Genotipo	Alelo de mutación	Altura (m) ± SD ¹	DTF (días) ± SD	Rendimiento (kg/ha) ± SD	Contenido en aceite (%) ± SD
Hib1	W574L	2,13±0,05 ^b	63,8±0,5 ^c	3053±198 ^a	45,48±0,7 ^{bc}
Hib2	W574L	2,15±0,06 ^b	62,8±0,5 ^c	3071±80 ^a	46,18±0,3 ^{ab}
Hib3	WT	2,28±0,05 ^a	66,3±0,5 ^{ab}	3370±311 ^a	47,13±0,2 ^a
Hib4	WT	2,18±0,05 ^{al}	66,5±0,6 ^a	3135±249 ^a	45,45±0,4 ^{bc}
Hib5	A205V	2,20±0,06 ^{ab}	65,3±0,5 ^b	3059±145 ^a	44,80±0,2 ^{cd}
Hib6	A205V	2,15±0,06 ^b	66,3±0,5 ^{ab}	3179±164 ^a	44,28±0,3 ^d
Medio		2,18	65,13	3144	45,6
² CV (%)		2,4	6,75	5,4	0,92
³ MS		0,00042	9,58	58798,7	4,06

Valor F		0,15	39,6	2,05	23,04
⁴ p		0,014	0,0001	0,13	0,0001
⁵ MSD		0,12	1,13	389,6	0,96
¹ SD: desviación típica, seguido de una letra que indica si allí existen diferencias entre híbridos: letras similares indican que no hay diferencias estadísticamente significativas. ² CV: coeficiente de variación ³ MS: cuadrado medio entre híbridos ⁴ P: valor de probabilidad del valor F. ⁵ MSD: diferencia significativa mínima de Tuckey.					

Tolerancia de la línea RW-B a 4 mezclas diferentes de dos herbicidas inhibidores de AHAS.

[0153] Objetivo: comparar el rendimiento (evaluado como índice de fitotoxicidad) de una línea que lleva el alelo W574L (RW-B) y líneas que portan los alelos P197L (SURES), A205V (IMISUN) y tipo salvaje (convencional).

[0154] Materiales: las siguientes líneas innatas de girasol fueron usadas: dos líneas susceptibles de imidazolinona ("B770" y "HA89"), dos resistentes a herbicidas SUs derivadas de población SURES ("SuBL" y "SuRL"), dos líneas resistentes a los Herbicidas IMIs derivadas de IMISUN ("RHA426" y "B770imi") y la línea "RW-B", que porta el alelo W574L. HA89 Y RHA426 son líneas innatas públicas liberadas por el USDA. B770 Y B770imi son líneas patentadas de Nidera S.A., mientras que B770imi tiene un contexto genético B770 que porta el gen de resistencia hmr1 (=alelo A205V) para resistencia a imidazolinonas. RW-B se obtuvo como se ha descrito anteriormente.

[0155] Método: ocho semillas de cada una de las siete líneas fueron sembradas en vasijas de 20 por 20 por 30 cm. Después de la emergencia, las plántulas fueron adelgazadas a mano dejando 4 plántulas por vasija. Cinco vasijas de cada línea fueron tratadas con una mezcla diferente de herbicidas. Una vasija de control no tratada de cada línea fue incluida en cada experimento. Las plantas se cultivaron en un invernadero bajo condiciones de luz natural suplementada con lámparas halógenas de 400 W para proporcionar un día de 14 h. Las temperaturas de día/de noche fueron 25 y 20°C, respectivamente. En la fase V4 de desarrollo (Schneider and Miller 1981) las plantas fueron pulverizadas con cuatro mezclas diferentes que contenían dos herbicidas inhibidores de AHAS diferentes, una sulfonilurea (metsulfurón) y una imidazolinona (imazapir). Las concentraciones de herbicidas de cada una de las cuatro mezclas herbicidas fueron de la siguiente manera: mezcla uno fue 20 g a.i./ha imazapir y 1.25 g a.i./ha metsulfurón, mezcla B fue 40 g a.i./ha imazapir y 2,5 g a.i./ha metsulfurón, mezcla C fue 80 g a.i./ha imazapir y 5 g a.i./ha metsulfurón y mezcla D fue 160g a.i./ha imazapir y 10 g a.i./ha metsulfurón.

[0156] Catorce días después del tratamiento las plantas fueron marcadas fenotípicamente utilizando un índice de fitotoxicidad (PI). El PI es una escala fenotípica de 0 a 9 que fue evaluada para cada vasija por inspección visual. Las plantas sin ningún síntoma se registraron como "0", niveles en aumento de retraso en el crecimiento y amarilleo con respecto a las plantas de control no tratadas se registraron como "1" a "4", niveles en aumento de anomalías en las hojas y necrosis en las hojas fueron registrados de "5" a "8" y las plantas muertas con necrosis total del ápice fueron registradas como "9". Los datos de PI para cada experimento fueron analizados por una prueba ANOVA; las medidas fueron comparadas por una prueba de Tuckey.

[0157] Los resultados se muestran en la tabla 8. Las líneas HA89 y B770 fueron matadas por todas las aplicaciones de mezclas herbicida. Las líneas resistentes al SU SuBL y SuRL mostraron algún nivel de tolerancia a la mezcla A y la mezcla B, pero alcanzaron un nivel alto de necrosis de hoja y retraso en el crecimiento según aumentaron las dosis de herbicidas, por ejemplo con la mezcla C. Todas las plantas fueron matadas con la mezcla D, que tuvo las máximas dosis de ingredientes activos. Las líneas resistentes a IMI RHA426 y B770imi fueron moderadamente resistentes a la mezcla A, mezcla B y mezcla C, aunque mostraron un daño aumentado cuando la dosis de herbicidas aumentó. Cuando la mezcla D fue aplicada a estas líneas, todas las plantas fueron matadas. Notablemente, RW-B, mostró tolerancia a todas las mezclas evaluadas, incluso en la mezcla que tenía la máxima concentración de ingredientes activos.

[0158] Conclusión: RW-B muestra no solo un nivel más alto de tolerancia a cada uno de los herbicidas de inhibidores de AHAS evaluados sino también, el máximo nivel de tolerancia a una combinación de herbicidas evaluados simultáneamente en una mezcla.

Tabla 8. Índice de fitotoxicidad medio de 7 líneas de girasol que portan diferentes eventos de mutación en el locus *AHAS1* cuando se inoculan a las 4 mezclas de dos herbicidas inhibidores de AHAS.

			Mezcla de herbicidas			
			A	B	C	D
	AHAS1	imazapir (ga.i.ha ⁻¹)	20	40	80	160
Genotipo	Alelo	metsulfurón (ga.i.ha ⁻¹)	1,25	2,5	5	10
B770	WT		9 ^a	9 ^a	9 ^a	9 ^a
Ha89	WT		9 ^a	9 ^a	9 ^a	9 ^a
SuBL	P197L		0,8 ^c	3 ^{cd}	8,4 ^a	9 ^a
SuRL	P197L		2,2 ^b	4,4 ^b	8,4 ^a	9 ^a
B770imi	A205V		1,2 ^c	2,2	4,4 ^c	8,8 ^a
Rha426	A205V		0,8 ^c	3,4 ^c	5,4 ^b	9 ^a
RW-B	W574L		0 ^d	0 ^e	0,2 ^d	0,8 ^b
Media			3,3	4,4	6,4	7,8
MS ¹			47,1	34,8	32,5	28,6
p ²			<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
MSD ³			0,634	0,835	0,919	0,495
¹ MS: cuadrado medio ² p: probabilidad ³ MSD: diferencia significativa mínima						

Respuesta de las líneas de girasol homocigóticas para el alelo W574L comparado con las líneas homocigóticas para los alelos A205V y P197L, y el haplotipo susceptible a imazapir en toda la planta.

[0159] Objetivo: este experimento fue llevado a cabo para cuantificar y contrastar la sensibilidad a imazapir de líneas de girasol que portan el alelo homocigótico W574L comparado con líneas homocigóticas para los alelos P197L y A205V en toda la planta.

Materiales:

[0160]

Tabla 9 muestra semillas de las diferentes líneas de girasol, que fueron obtenidas bajo condiciones de campo.

Código	Alelo
B770	Tipo salvaje (susceptible)
B770IMI	A205V
SuBL	P197L
RW-B	W574L

[0161] Se sembraron semillas en placas de Petri y, después de la germinación, las plántulas fueron trasplantadas a vasijas de 10 cm de diámetro en unos medios de encapsulamiento consistentes en partes iguales de vermiculita, tierra y arena. Las plantas se cultivaron en un invernadero bajo condiciones de luz natural suplementada con lámparas halógenas de 400 W para proporcionar un día de 16 h de duración. Las temperaturas de día/de noche fueron 25 y 20°C, respectivamente. En la fase V2-V4 (Schneider & Miller, 1981) 10 plantas de cada genotipo fueron asignadas de forma aleatoria a cada tratamiento que consistió en ocho dosis de imazapir (0, 40, 80, 160, 320, 480, 640 y 800 g ai/ha, sin tratamiento, 0,5x, 1x, 2x, 4x, 6x, 8x y 10x respectivamente), y una determinación de biomasa de tiempo cero. El experimento se realizó como un diseño de bloque aleatorizado con una disposición factorial completa (línea de girasol x tratamiento) de tratamientos y 10 replicaciones.

[0162] En el día de la aplicación del herbicida diez plantas de cada genotipo fueron cortadas en el nodo cotiledonal y secadas a 60°C durante 48 horas para determinar el peso en seco a tiempo cero.

[0163] Las plantas restantes fueron mantenidas durante 14 días después del tratamiento con imazapir (DAT) y su altura,

índice de fitotoxicidad (PI) y biomasa sobre el suelo seco fueron determinados. La altura fue determinada como la distancia entre el nodo cotiledonal y el ápice de cada planta. Los datos de biomasa sobre el suelo de cada línea fueron convertidos a acumulación de biomasa después de aplicación por sustracción de la biomasa de tiempo cero media apropiada de cada muestra. Los datos de biomasa seca fueron convertidos en porcentajes de las plantas de control no tratadas dentro de cada línea para permitir comparaciones directas entre grupos. El PI es una escala fenotípica de 0 a 9 que fue evaluada para cada planta por inspección visual. Las plantas sin síntomas fueron registradas como "0", niveles en aumento de retraso en el crecimiento y clorosis con respecto a las plantas de control no tratadas fueron registrados como "1" a "4", niveles en aumento de anomalías en las hojas y necrosis en las hojas fueron registrados de "5" a "8", y plantas muertas con necrosis total del ápice fueron registradas como "9".

[0164] Resultados:

Altura. Después de la aplicación de imidazolinona la altura de la planta fue seriamente reducida en las líneas susceptible (B770) y tolerante a SU (SuBL). De hecho, incluso en el índice inferior de pulverización de herbicida (0,5x), la altura fue reducida de 100% en las plantas de control no tratadas a 35,0% y 42,7% en las líneas susceptible y tolerante a SU, respectivamente. La línea tolerante a IM1 (B770IMI) mostró una reducción significativa en la altura solo después del índice 2x de aplicación herbicida, y luego, según aumentó el índice de herbicida la reducción de altura fue superior, acercándose al mismo nivel que la línea susceptible a 10x (32,8%).

[0165] En cambio, la línea de girasol RW-B mostró una reducción de altura menor cuando se inoculó con dosis aumentadas de imidazolinonas. Esta reducción en la altura alcanzó solo el 75% de las plantas de control no tratadas de 4x a 10 x índices de aplicación de herbicida. (Tabla 10 y figura 9).

Tabla 10. Reducción de altura (como porcentaje de las plantas de control no tratadas) para 4 líneas que portan alelos mutantes diferentes en el locus *AHASL1* de girasol cuando se inoculan con índices aumentados de imazapir.

Altura (como % de las plantas no tratadas)								
Dosis (x)	0	0,5	1	2	4	6	8	10
SuBL	100	42,7 ^b	39,1 ^b	37,2 ^c	37,0 ^c	36,1 ^c	35,5 ^c	35,1 ^b
B770IMI	100	97,7 ^a	95,2 ^a	70,2 ^b	64,0 ^b	51,9 ^b	40,7 ^b	32,8 ^c
B770	100	35,0 ^c	31,8 ^c	31,9 ^d	31,9 ^d	31,6 ^d	31,7 ^d	31,4 ^c
RW-B	100	98,0 ^a	95,4 ^a	85,7 ^a	75,6 ^a	73,9 ^a	73,9 ^a	73,4 ^a
Media	68,3	65,4	56,2	52,1	48,4	45,4	43,2	MS1
2926,8	3008,3	1682,6	1109,8	913,7	934,1	1022,3	P2	<0,0001
<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	MSD3	1,27	1,287
1,159	1,216	1,129	1,294	1,558				
¹ MS: cuadrado medio								
² P: probabilidad								
³ MSD: diferencia significativa mínima								

Índice de fitotoxicidad

[0166] Los cuatro mutantes evaluados mostraron grandes diferencias en sus síntomas después de la aplicación de índices aumentados de imazapir. La línea de girasol RW-B mostró solo una ligera reducción de tamaño de hoja y color verde más claro que las plantas de control según aumentaban los índices de herbicida (tabla 11). En cambio, aunque las plantas que portan el alelo A205V (B770IMI) no mostraron ningún daño en el índice 0,5x, presentaron un nivel aumentado de daño (clorosis, deformación de la hoja y necrosis de la hoja) según las dosis de imazapir aumentaron de 1 x a 10x. Las líneas susceptibles y tolerantes a Su mostraron un comportamiento casi idéntico: una susceptibilidad total de 0,5x a 10 x índices de aplicación de herbicida.

Tabla 11. Índice de fitotoxicidad para 4 líneas de girasol que portan alelos mutantes diferentes en el locus *AHASL1* de girasol cuando se inoculan con índices aumentados de imazapir.

Dosis (x)								
	0	0,5	1	2	4	6	8	10
B770	0	8,9 ^a	9 ^a	9 ^a	9 ^a	9 ^a	9 ^a	9 ^a
SuBL	0	8,6 ^a	9 ^a	9 ^a	9 ^a	9 ^a	9 ^a	9 ^a
B770IMI	0	0,2 ^b	1,7 ^b	4,5 ^b	4,9 ^b	5,8 ^b	6,8 ^b	7 ^b
RW-B	0	0 ^b	0,1 ^c	0,7 ^c	0,9 ^c	1,5 ^c	2,3 ^c	2,4 ^c

Media		4,4	4,9	5,8	5,9	6,3	6,8	6,8
ms1		62,5	55,9	40,3	37,8	31,6	25,0	24,3
P2		<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
MSD3		0,464	0,605	0,421	0,365	0,445	0,498	0,428
¹ MS: cuadrado medio ² P: probabilidad ³ LSD: diferencia significativa mínima								

Biomasa de peso en seco sobre el suelo

- [0167] Curvas de respuesta a la dosis para peso en seco de mutantes W574L, P197L y 205V se muestran en la fig. 11.
- 5 Peso en seco de biomasa de evento W574L en la condición homocigótica se redujo con respecto a las plantas de control no tratadas solo en 6x, 8x y 10x índices de aplicación herbicida. El peso en seco de plantas RW-B en 10x índice fue 78% de los controles no tratados. Mientras tanto, el peso en seco de todos los demás mutantes y línea de tipo salvaje difirieron significativamente de los de la línea RW-B en cada una de las dosis evaluadas (tabla 12).
- 10 Tabla 12. Biomasa de peso en seco sobre el suelo (como porcentaje de las plantas de control no tratadas) par 4 líneas de girasol que portan alelos mutantes diferente en el locus *AHASL1* de girasol cuando se inoculan con índices aumentados de imazapir.

Peso en seco (como un % de las plantas no tratadas)								
Dosis (x)	0	0,5	1	2	4	6	8	10
SuBL	100	46,6 ^c	41,3 ^c	38,9 ^c	38,0 ^c	37,8 ^c	37,4 ^c	36,4 ^c
B770IMI	100	96,2 ^b	88,5 ^b	73,7 ^b	69,0 ^b	62,5 ^b	52,1 ^b	42,2 ^b
B770	100	32,7 ^d	30,2 ^d	27,6 ^d	26,5 ^d	25,9 ^d	25,7 ^d	25,2 ^d
RW-B	100	99,1 ^a	97,9 ^a	97,0 ^a	92,1 ^a	85,1 ^a	80,2 ^a	78,2 ^a
Media		68,6	64,5	59,3	56,4	52,8	48,8	45,5
MS ¹		2888,5	2839,5	2542,4	2222,2	1738,9	1384,3	1312,9
P ²		<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
MSD ³		1,127	1,009	1,480	1,137	1,076	0,846	1,377
¹ MS: cuadrado medio ² P: probabilidad ³ LSD: diferencia significativa mínima								

- 15 [0168] Conclusión: la línea RW-B, que porta el evento mutante W574L en la condición homocigótica en el locus *AHASL1* de girasol, presentó un nivel superior de tolerancia a todas las dosis evaluadas de imazapir que las líneas tolerantes a Su y tolerantes a IMI conocidas.

20 Respuesta del alelo mutante W574L comparado con las mutaciones A205V y P197L y el haplotipo susceptible a metsulfurón en toda la planta.

[0169] Objetivo: este experimento se llevó a cabo para cuantificar y contrastar la sensibilidad a metsulfurón en toda la planta de las líneas de girasol que portan el alelo W574L en la condición homocigótica con líneas homocigóticas que llevan los alelos P197L y A205V

25 Materiales:

[0170]

30 Tabla 13 muestra las semillas de las diferentes líneas de girasol, que fueron obtenidas bajo condiciones de campo

Código	Alelo
B770	WT - Susceptible
B770IMI	A205V
SuBL	P197L
RW-B	W574L

[0171] Las semillas fueron sembradas en placas de Petri y, después de la germinación, las plántulas fueron trasplantadas a vasijas de 10 cm de diámetro en unos medios de encapsulamiento consistentes en partes iguales de vermiculita, tierra y arena. Las plantas se cultivaron en un invernadero bajo condiciones de luz natural suplementada con lámparas halógenas de 400W para proporcionar una duración de luz de 16hr. Las temperaturas de día/de noche fueron 25 y 20°C, respectivamente. En la fase V2-V4 (Schneiter & Miller, 1981) 10 plantas de cada genotipo fueron asignadas de forma aleatoria a cada tratamiento consistente en ocho dosis de imazapir (0, 2,5, 5, 10, 15, 20 g ai/ha, sin tratamiento, 0,5x, 1x, 2x, 3x y 4x respectivamente), y una determinación de biomasa de tiempo cero. El experimento fue dispuesto como un diseño de bloque aleatorizado con una disposición factorial completa (línea de girasol x tratamiento) de tratamientos y 10 replicaciones.

[0172] En el día de la aplicación de herbicida, diez plantas de cada genotipo fueron cortadas en el nodo cotiledonal y secadas a 60°C durante 48 horas para determinación de peso seco de tiempo cero.

[0173] Las plantas restantes fueron mantenidas durante 14 días después del tratamiento con imazapir (DAT) y su índice de fitotoxicidad (PI) y biomasa sobre el suelo seco fueron determinados. Los datos de biomasa sobre el suelo de cada línea fueron convertidos en acumulación de biomasa después de la aplicación por sustracción de la biomasa de tiempo cero media apropiada de cada muestra. Los datos de biomasa seca fueron convertidos en porcentajes de las plantas de control no tratadas dentro de cada línea para permitir comparaciones directas entre grupos. El PI es una escala fenotípica de 0 a 9 que fue evaluada para cada planta por inspección visual. Las plantas sin síntomas fueron registradas como "0", niveles en aumento de retraso en el crecimiento y clorosis con respecto a las plantas de control no tratadas fueron registrados como "1" a "4", niveles en aumento de anomalías en las hojas y necrosis en las hojas fueron registrados de "5" a "8" y plantas muertas con necrosis total del ápice fueron registradas como "9".

Resultados

[0174] Índice de fitotoxicidad: los mutantes mostraron grandes diferencias en su respuesta a índices aumentados de aplicación de metsulfurón (tabla 13 y figura 12). El genotipo convencional (B770) fue matado incluso en las dosis inferiores de metsulfurón. La línea de girasol que portaba la mutación W574L en la condición homocigótica mostró solo una reducción ligera del tamaño de planta y color verde más claro que las plantas de control según los índices de herbicida aumentaron de 0,5 a 3x (tabla 13). De hecho, sólo mostró clorosis y deformaciones cuando 4x índice de metsulfurón fue aplicado. En cambio, la línea que portaba el alelo A205V (B770IMI) mostró un nivel aumentado de daño de 0,5x a 4x índice. De hecho, en el 2x índice de aplicación de metsulfurón, casi todas las plantas de esta línea fueron matadas por el herbicida.

[0175] La línea tolerante a Su (SuBL), que porta el ya conocido alelo mutante para tolerancia a sulfonilurea en el girasol, no mostró ninguno de los síntomas o una ligera clorosis en dosis 0,5x y 1x de aplicación de metsulfurón, pero entonces su nivel de daño aumentó, alcanzando una puntuación de 9 (todas las plantas fueron matadas por el herbicida) en 4x índice de metsulfurón.

Tabla 13. Índice de fitotoxicidad para 4 líneas de girasol que portan alelos mutantes diferente en el locus *AHASL1* de girasol cuando se inoculan con índices aumentados de metsulfurón.

Dosis (x)						
	0	0,5	1	2	3	4
B770	0	9 ^a	9 ^a	9 ^a	9 ^a	9 ^a
SuBL	0	0,1 ^c	1,7 ^c	4,3 ^c	7,2 ^b	9 ^a
B770IMI	0	3,3 ^b	5,2 ^b	8,5 ^b	9 ^a	9 ^a
RW-B	0	0 ^c	0,6 ^d	1,1 ^d	2,8 ^c	5,6 ^b
Media		3,10	4,13	5,73	7,00	8,15
MS ¹		178,2	144,1	139,5	85,6	28,9
P ²		<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
MUD ³		0,325	0,498	,430	0,387	0,316
¹ MS: cuadrado medio						
² P: probabilidad						
³ LSD: diferencia significativa mínima						

Resultados:

[0176] Biomasa de peso en seco sobre el suelo: las curvas de respuesta a la dosis para peso en seco de mutantes W574L, P197L y A205V se muestran en la figura 5 y la tabla 14. Las líneas tolerantes y susceptibles a IMI mostraron

una reducción inmediata en el peso en seco después de la aplicación de herbicida. La biomasa de la línea tolerante a Su fue reducida de 83,3% a 30,3% de las plantas de control no tratadas como índices de metsulfurón aumentado de 0,5 a 4x.

- 5 [0177] De manera interesante, la línea RW-B no mostró una reducción significativa en el peso en seco a 0,5 y 1x índice de aplicación de metsulfurón. Según aumentaron las dosis, una reducción significativa de peso en seco fue observada. Sin embargo, esta línea mostró significativamente un peso en seco más alto que cualquiera de las otras líneas en cada una de las dosis evaluadas.
- 10 Tabla 14. Biomasa de peso en seco sobre el suelo (como porcentaje de las plantas de control no tratadas) para 4 líneas de girasol que portan alelos mutantes diferente en el locus *AHASL1* de girasol cuando se inoculan con índices aumentados de metsulfurón.

Peso en seco (como un % de las plantas no tratadas)						
Dosis (x)	0	0,5	1	2	3	4
SuBL	100	83,3 ^b	72,4 ^b	52,2 ^b	35,7 ^b	30,3 ^b
B770IMI	100	42 ^c	30,1 ^c	30,4 ^c	30 ^c	30,2 ^b
Suscp	100	23,7 ^d	20 ^d	19,4 ^d	19,2 ^d	19,4 ^c
RW-B	100	94,6 ^a	90,4 ^a	73,9 ^a	60,7 ^a	38,1 ^a
Media		60,9	53,2	44,2	36,4	29,5
MS ¹		11261,7	11294,4	5895,2	3092,6	590,3
P ²		<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
MSD ³		2,998	2,099	2,07	1,630	1,992
¹ MS: cuadrado medio ² P: probabilidad ³ LSD: diferencia significativa mínima						

- 15 [0178] Conclusión: la línea RW-B, que porta el evento mutante W574L en la condición homocigótica en el locus *AHASL1* de girasol, presentó un nivel superior de tolerancia a todas las dosis evaluadas de metsulfurón que las líneas tolerantes a IMI y tolerantes a SU ya conocidas.

Referencias

- 20 [0179]
- Al-Khatib K., J.R. Baumgartner, D.E. Peterson, and R.S. Currie. 1998. Imazethapyr resistance in common sunflower (*Helianthus annuus*). *Weed Sci.* 46:403-407.
- 25 Al-Khatib K., and J.F. Miller. 2002. Registration of four genetic stocks of sunflower resistant to imidazolinone herbicides. *Crop Sci.* 40:869-870.
- Anderson, P. C. and M. Georgeson. 1989. Herbicide-tolerant mutants of corn. *Genome* 34:994-999.
- Ashburner, M. 1990. *Drosophila*, A Laboratory Handbook. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- 30 Bently, A., B. Mac Lennan, J. Calvo, and C.R. Dearolf. 2000. Targeted recovery of mutations in *Drosophila*. *Genetics* 156:1169-1173.
- Bernasconi, P., A.R. Woodworth, B.A. Rosen, M.V. Subramanian, and D.L. Siehl. 1995. A naturally occurring point mutation confers broad range tolerance to herbicides that target acetolactate synthase. *J. Biol. Chem.* 270:17381-17385.
- 35 Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72:248-254.
- Bruniard J.M. and J.F. Miller. 2001. Inheritance of imidazolinone herbicide resistance in sunflower. *Helia* 24:11-16.
- Chong, C.K. and J.D. Choi. 2000. Amino acid residues conferring herbicide tolerance in tobacco acetolactate synthase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 279 :462-467.
- Croughan, T. P. 1996. Herbicide resistant rice. U.S. patent 5,545,822.
- 40 Devine, M. D., M.A.S. Marles, and L. M. Hall. 1991. Inhibition of acetolactate synthase in susceptible and resistant biotypes of *Stellaria media*. *Pestic. Sci.* 31:273-280.
- D'Halluin, K. M., M. Bossut, E. Bonne, B. Mazur, J. Leemans, and J. Botterman. 1992. Transformation of sugarbeet (*Beta vulgaris* L.) and evaluation of herbicide resistance in transgenic plants. *Bio/Technology* 10:309-314.
- Duggleby, R. G. and S. S. Pang. 2000. Acetohydroxyacid synthase. *J. Biochem. Mol. Biol.* 33:1-36.
- 45 Grula J.W., R.L. Hudspeth, S.L. Hobbs and D.M. Anderson. 1995. Organization, inheritance and expression of acetohydroxyacid synthase genes in the cotton allotetraploid *Gossypium hirsutum*. *Plant Mol. Biol.* 28:837-846.
- Guttieri, M.J., C.V. Eberlein, C.A. Mallory-Smith, D.C. Thill, and D.L. Hoffman. 1992. DNA sequence variation in Domain A of the acetolactate synthase genes of herbicide-resistant and -susceptible weed biotypes. *Weed Sci.* 40:670-676.

- Guttieri, M.J., C.V. Eberlein, and D.C. Thill. 1995. Diverse mutations in the acetolactate synthase allele confer chlorsulfuron resistance in *Kochia scoparia* biotypes. *Weed Sci.* 43:175-178.
- Harms, C.T., S.L. Armour, J.J. DiMaio, L.A. Middlesteadt, D. Murray, D.V. Negrotto, H. Thompson-Tyler, K. Weymann, A.L. Montoya, R.D. Shillito, and G.C. Jen. 1992. Herbicide resistance due to amplification of a mutant ace-tohydroxyacid synthase allele. *Mol. Gen. Genet.* 233:427-435.
- Hart, S.E., J.W. Saunders, and D. Penner. 1992. Chlorsulfuron resistant sugar beet: Cross-resistance and physiological basis of resistance. *Weed Sci.* 40:378-383.
- Haughn, G.W., J. Smith, B. Mazur, and C. Somerville. 1988. Transformation with a mutant *Arabidopsis* acetolactate synthase gene renders tobacco resistant to sulfonylureas. *Mol. Gen. Genet.* 211:266-271.
- Inukai, T., A. Sako, H.Y. Hirano, and Y. Sano. 2000. Analysis of intragenic recombination at *wx* in rice: Correlation between molecular and genetic maps within the locus. *Genome* 43:589-596.
- Jander, G., S.R. Baerson, J.A. Hudak, K.A. Gonzalez, K.J. Gruys, and R.L. Last. 2003. Ethylmethanesulfonate saturation mutagenesis in *Arabidopsis* to determine frequency of herbicide resistance. *Plant Physiol.* 131:139-146.
- Kolkman, J.M., M.B. Slabaugh, J.M. Bruniard, S. Berry, B.S. Bushman, C. Olungu, N. Maes, G. Abratti, A. Zambelli, J.F. Miller, A. Leon, and S.J. Knapp. 2004. Acetohydroxyacid synthase mutations conferring resistance to imidazolinone or sulfonylurea herbicides in sunflower. *Theor. Appl. Genet.* 109:1147-1159.
- Kozik A., R.W. Michelmore, S.J. Knapp, M.S. Matvienko, L. Rieseberg, H. Lin, M. van Damme, D. Lavelle, P. Chevalier, J. Ziegler, P. Ellison, J.M. Kolkman, M.B. Slabaugh, K. Livingston, L.Z. Zhou, S. Church, S. Edberg, L. Jackson, R. Kesseli and K. Bradford. 2002. Sunflower and lettuce ESTs from the compositae genome project. <http://compgenomics.ucdavis.edu>
- Lee, Y.T. and R.G. Duggleby. 2001. Identification of the regulatory subunit of *Arabidopsis thaliana* acetohydroxyacid synthase and reconstitution with its catalytic subunit. *Biochemistry* 40:6836-6844.
- Lee, Y.T. and R.G. Duggleby. 2002. Regulatory interactions in *Arabidopsis thaliana* acetohydroxyacid synthase. *FEBS Lett.* 512:180-184.
- Lee, K.Y., J. Townsend, J. Tepperman, M. Black, C.F. Chui, B. Mazur, P. Dunsmuir, and J. Bedbrook. 1988. The molecular basis of sulfonylurea resistance in tobacco. *EMBO J.* 7:1241-1248.
- Mallory-Smith C.A., D.C. Thill and M.J. Dial. 1990. Identification of sulfonylurea herbicide-resistant prickly lettuce (*Lactuca serriola*). *Weed Technol.* 4:163-168.
- Marshall M.W., K. Al-Khatib, and T. Loughin. 2001. Gene flow, growth, and competitiveness of imazethapyr-resistant common sunflower. *Weed Sci.* 49:14-21.
- Massinga RA, K. Al-Khatib, P. St. Amand and J.F. Miller. 2003. Gene flow from imidazolinone-resistant domesticated sunflower to wild relatives. *Weed Sci.* 51:854-862.
- McCourt, J.A. and R.G. Duggleby. 2006. Acetohydroxyacid synthase and its role en the biosynthetic pathway for branched-chain amino acids. *Amino Acids* 31(2):173.
- McCourt, J.A., S.S. Pang, J. King-Scott, L.W. Guddat and R.G. Duggleby. 2006. Herbicide-binding sites revealed in the structure of plant acetohydroxyacid synthase. *PNAS* 103(3): 569-573.
- McHughen, A. 1989. *Agrobacterium* mediated transfer of chlorsulfuron resistance to commercial flax cultivars. *Plant Cell Rep.* 8:445-449.
- McNaughton, K.E., J. Letarte, E.A. Lee and F.J. Tardif. 2005. Mutations in ALS confer herbicide resistance in redroot pigweed (*Amaranthus retroflexus*) and Powell amaranth (*Amaranthus powellii*). *Weed Sci.* 53:17-22.
- Miller J.F., and K. Al-Khatib. 2002. Registration of imidazolinone herbicide-resistant sunflower maintainer (HA425) and fertility restorer (RHA426 and RHA427) germplasms. *Crop Sci.* 42:988-989.
- Miller J.F., and K. Al-Khatib. 2004. Registration of two oilseed sunflower genetic stocks, SURES-1 and SURES-2, resistant to tribenuron herbicide. *Crop Sci.* 44:1037-1038.
- Milliman, L.D., D.E. Riechers, L.M. Wax and F.W. Simmons. 2003. Characterization of two biotypes of imidazolinone-resistant eastern black nightshade (*Solanum ptycanthum*). *Weed Sci.* 51:139-144.
- Mourad, G., and J. King. 1992. Effect of four classes of herbicides on growth and acetolactate synthase activity in several variants of *Arabidopsis thaliana*. *Planta* 188:491-497.
- Newhouse, K., B.K. Singh, D.L. Shaner, and M. Stidham. 1991. Mutations in corn (*Zea mays* L.) conferring resistance to imidazolinones. *Theor. Appl. Genet.* 83:65-70.
- Newhouse, K., W. Smith, M. Starrett, T. Schaefer, and B.K. Singh. 1992. Tolerance to imidazolinone herbicides in wheat. *Plant Physiol.* 100:882-886.
- Ouellet T., R.G. Rutledge and B.L., Miki. 1992. Members of the acetohydroxyacid synthase multigene family of *Brassica napus* have divergent patterns of expression. *Plant J.* 2:321-330.
- Powles S.B. and J.A.M. Holtum. 1994. Herbicide resistance in plants: biology and biochemistry. Lewis Publishers. Boca Raton, Fla.
- Pozniak C.J., and P.J. Hucl. 2004. Genetic analysis of imidazolinone resistance in mutation-derived lines of common wheat. *Crop Sci.* 44:23-30.
- Preston, C. and C.A. Mallory-Smith. 2001. Biochemical mechanisms, inheritance, and molecular genetics of herbicide resistance in weeds. In: S.B. Powles and D.L. Shaner (eds). *Herbicide Resistance and World Grains*, CRC Press, Boca Raton, FL, pp 23-60.
- Rajasekaran, K., J.W. Grula, and D.M. Anderson. 1996. Selection and characterization of mutant cotton (*Gossypium hirsutum* L.) cell lines resistant to sulfonylurea and imidazolinone herbicides. *Plant Sci.* 199:115-124.
- Ray, T.B. 1984. Site of action of chlorsulfuron. Inhibition of valine and isoleucine biosynthesis in plants. *Plant Physiol.* 75:827-831.
- Saari, L. L., J. C. Cotterman, and D. C. Thill. 1994. Resistance to acetolactate synthase inhibiting herbicides. Pages 83-139 in S. B. Powles and J.A.M. Holtum, eds. *Herbicide Resistance in Plants: Biology and Biochemistry*. Ann Arbor, MI:

- Lewis.
- Sala, C.A, Bulos, M. & Echarte, A.M. 2008a. Genetic analysis of an induced mutation conferring imidazolinone resistance in sunflower. *Crop Science* 48:1817-1822.
- 5 Sala, C.A., M. Bulos, M. Echarte, S.R. Whitt, R. Ascenzi. 2008b. Molecular and biochemical characterization of an induced mutation conferring imidazolinone resistance in sunflower. *Theoretical and Applied Genetics* 108 (1): 115-112.
- Santel, H.J., B.A. Bowden, V.M. Sorenson, K.H. Mueller, and J. Reynolds. 1999. Flucarbazone-sodium-a new herbicide for grass control in wheat. *Proc. West. Soc. Weed Sci.* 52:124-125.
- Schneiter, A.A., and J.F. Miller. 1981. Description of sunflower growth stages. *Crop Sci.* 21:901-903.
- 10 Sebastian, S.A., G.M. Fader, J.F. Ulrich, D.R. Forney, and R.S. Chaleff. 1989. Semi-dominant soybean mutation for resistance to sulfonylurea herbicides. *Crop Sci.* 29:1403-1408.
- Seefeldt, S.S., J.E. Jensen and E.P. Fuerst. 1995. Log-logistic analysis of herbicide dose response relationships. *Weed Technol.* 9:218-227.
- Shaner D.L. 1991. Physiological effects of the imidazolinone herbicides. In: Shaner DL, O'Connor SL (eds) *The imidazolinone herbicides*. Lewis, Ann Arbor, Mich., pp 129-138.
- 15 Shaner, D.L., P.C. Anderson, and M.A. Stidham. 1984. Imidazolinones: Potent inhibitors of acetohydroxyacid synthase. *Plant Physiol.* 76:545-546.
- Singh, B.K. 1999. Biosynthesis of valine, leucine and isoleucine. P. 227-247. In B.K. Singh (ed.) *Plant amino acids*. Marcel Dekker Inc., New York.
- Singh, B.K., M.A. Stidham, and D.L. Shaner. 1988. Assay of acetohydroxyacid synthase. *Ann. Biochem.* 171:173-179.
- 20 Snow, E.T., R.S. Foote, and S. Mitra. 1984. Base-pairing properties of O-6-Methylguanine in template DNA during in vitro DNA replication. *J. Biol. Chem.* 259:8095-8100.
- Subramanian, M.V., and B.C. Gerwick. 1989. Inhibition of acetolactate synthase by triazolopyrimidines: a review of recent developments. P. 277-288. In J.R. Whitaker, P.E. Sonnet, eds, *Biocatalysis in Agricultural Biotechnology*. American Chemical Society, Washington, DC.
- 25 Subramanian, M.V., H.Y. Hung, J.M. Dias, V.W. Miner, J.H. Butler, and J.J. Jachetta. 1990. Properties of mutant acetolactate synthases resistant to triazolopyrimidine sulfonanilide. *Plant Physiol.* 94:239-244.
- Swanson, E.B., M.J. Hergesell, M. Arnoldo, D.W. Sippell, and R.S.C. Wong. 1989. Microspore mutagenesis and selection: Canola plants with field tolerance to imidazolinones. *Theor. Appl. Genet.* 78:525-530.
- Tan, S., R.R. Evans, M.L. Dahmer, B.K. Singh, and D.L. Shaner. 2005. Imidazolinone-tolerant crops: history, current status and future. *Pest Manag. Sci.* 61:246-257.
- 30 Tranel, P.J. and T.R. Wright. 2002. Resistance of weeds to AHAS inhibiting herbicides: what have we learned? *Weed Sci* 50:700-712.
- Trucco, F., A.G. Hager and P.J. Tranel. 2006. Acetolactate synthase mutation conferring imidazolinone-specific herbicide resistance in *Amaranthus hybridus*. *J. Plant Physiol.* 163:475-479.
- 35 Umbarger, H.E. 1978. Amino acid biosynthesis and its regulation. *Annu. Rev. Biochem.* 47:533-606.
- White A.D., M.D. Owen, R.G. Hartzler, and J. Cardina. 2002. Common sunflower resistance to acetolactate-inhibiting herbicides. *Weed Sci.* 50:432-437.
- Wright, T.R., N.F. Bascomb, S.F. Sturmer, and D. Penner. 1998. Biochemical mechanism and molecular basis for ALS-inhibiting herbicide resistance in sugar beet (*Beta vulgaris*) somatic cell selections. *Weed Sci.* 46:13-23.
- 40 Wright, T.R., and D. Penner. 1998. Cell selection and inheritance of imidazolinone resistance in sugar beet (*Beta vulgaris*). *Theor. Appl. Genet.* 96:612-620.

REIVINDICACIONES

1. Planta de girasol o descendiente de la misma que tiene al menos una copia de al menos un gen que codifica un polinucleótido de una subunidad grande de una acetohidroxiácido sintasa (AHASL), donde dicho polinucleótido AHASL codifica una proteína AHASL que confiere resistencia a un herbicida de imidazolinona, un herbicida de sulfonilurea, un herbicida de triazolopirimidina y un herbicida de pirimidiniloxibenzoato, dicha proteína AHASL comprende una mutación en la posición del aminoácido 574 o posición equivalente, donde la posición del aminoácido 574 o posición equivalente es leucina, y donde dicha planta de girasol o descendiente de la misma tiene resistencia aumentada a un herbicida de imidazolinona, un herbicida de sulfonilurea, un herbicida de triazolopirimidina y un herbicida de pirimidiniloxibenzoato, en comparación con una planta de girasol de tipo salvaje.
2. Planta de girasol según la reivindicación 1, donde dicho polinucleótido AHASL codifica una proteína AHASL que confiere resistencia a una mezcla de herbicidas que inhiben la acetohidroxiácido sintasa (AHAS), los herbicidas que inhiben AHAS son un herbicida de imidazolinona, un herbicida de sulfonilurea, un herbicida de triazolopirimidina y un herbicida de pirimidiniloxibenzoato.
3. Planta de girasol según la reivindicación 1 o 2, donde dicha planta de girasol tiene un gen AHASL1 con la secuencia de nucleótidos expuesta en SEC ID n.º: 1 (figura 7).
4. Planta de girasol según cualquiera de las reivindicaciones 1-3, donde dicha planta de girasol produce una proteína AHASL1 que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en SEC ID n.º: 2 (figura 8).
5. Ácido nucleico aislado que comprende SEC ID n.º: 1 (figura 7).
6. Casete de expresión que comprende un promotor activo en plantas operativamente enlazado a un ácido nucleico aislado que codifica una proteína que comprende la secuencia codificada por el ácido nucleico aislado según la reivindicación 5.
7. Planta de girasol transgénica, donde dicha planta comprende un transgén que comprende el ácido nucleico aislado según la reivindicación 5.
8. Planta de girasol según cualquiera de las reivindicaciones 1-4 o 7, donde dicha planta de girasol tiene una cabeza única.
9. Planta de girasol según cualquiera de las reivindicaciones 1-4, 7 u 8, donde el rendimiento de semilla de dicha planta de girasol es más de una tonelada por hectárea.
10. Semilla de girasol que tiene un gen AHASL1 con la secuencia de nucleótidos expuesta en SEC ID n.º: 1 (figura 7).
11. Polen de una planta de girasol donde el polen comprende un gen AHASL1 con la secuencia de nucleótidos expuesta en SEC ID n.º: 1 (figura 7).
12. Óvulo de una planta de girasol donde el óvulo comprende un gen AHASL1 con la secuencia de nucleótidos expuesta en SEC ID n.º: 1 (figura 7).

FIG. 1

		*
AY541451	GAAAATCTGCCGGTTAAGATTTTATTACTTAACAACCAGCATTGGGTATGGTGGTTCAGTGGGAGGA	
B770	GAAAATCTGCCGGTTAAGATTTTATTACTTAACAACCAGCATTGGGTATGGTGGTTCAGTGGGAGGA	
RW-B	GAAAATCTGCCGGTTAAGATTTTATTACTTAACAATCAGCATTGGGTATGGTGGTTCAGTGGGAGGA	
U16280	GAAAATCTTCTGTGTTAAGATTTTGTACTTAACAATCAGCATTGGGTATGGTGGTTCAGTGGGAGGA	
AY124092	GAGCAACTCCAGTGAAGATACTCTTATTAAACAACCAGCATCTTGGCATGGTTATGCAATGGGAAGA	
	^	^
	1660	1721
AY541451	TCGGTTTTACAAGGCGAATCGGGCTCATACCTACTTAGGAAACCCGTCAAAAGAG	
B770	TCGGTTTTACAAGGCGAATCGGGCTCATACCTACTTAGGAAACCCGTCAAAAGAG	
RW-B	TCGGTTTTACAAGGCGAATCGGGCTCATACCTACTTAGGAAACCCGTCAAAAGAG	
U16280	TCGGTTTTACAAGGCGAATCGGGCTCATACCTACTTAGGAAATCCGTCAAAAGAG	
AY124092	TCGGTTTTACAAGGCTAACCGAGCTCACACATTTCTCGGGATCCGGCTCAGGAG	

FIG. 2

	*
AY541451	ENLPVKILLNNQHLGMVVQWEDRFYKANRAHTYLGNSPSKE
B770	ENLPVKILLNNQHLGMVVQWEDRFYKANRAHTYLGNSPSKE
RW-B	ENLPVKILLNNQHLGMVVQLEDRFYKANRAHTYLGNSPSKE
U16280	ENLPVKILLNNQHLGMVVQWEDRFYKANRAHTYLGNSPSKE
AY124092	EQLPVKILLNNQHLGMVMQWEDRFYKANRAHTFLGDPAQE
	^
	554 574

FIG. 3

Tabla 1

Cruce	Plantas F1					Poblaciones F2					Poblaciones BC1F1				
	Número de plantas obtenidas					Número de plantas obtenidas					Número de plantas obtenidas				
	R	I	S	R	S	R	I	S	R	S	R	I	S	Proporción evaluada	X2 valor p
HA89/RW-73	0	23	0	129	102	247	247	102	0	157	61	1:1	0,31		
B770/RW-73	0	31	0	152	165	305	305	165	0	317	97	1:1	0,46		

FIG. 4
Tabla 2

Genotipo	Mutación	Sulfonilureas			Imidazolinonas			Pirimidinil- tiobenzato	Triazolopirimidinas
		foramsulfurón 240 gr a.i./ha	clorsulfurón 25 gr a.i./ha	nicosulfurón 100 gr a.i./ha	imazamox 100 gr a.i./ha	imazapir 160 gr a.i./ha	imazapic 100 gr a.i./ha		
B770	WT	9,0c	8,8c	9,0b	9,0c	9,0c	9,0c	9,0d	9,0b
HA89	WT	8,7c	9,0c	9,0b	9,0c	9,0c	9,0c	8,5cd	9,0b
SuBL	P197L	0,0a	0,0a	0,0a	9,0c	9,0c	9,0c	8,0c	9,0b
SuRL	P197L	0,0a	0,0a	0,0a	9,0c	9,0c	9,0c	8,5cd	9,0b
Hha426	A205V	6,5b	6,0b	8,6b	5,4b	2,0b	6,5b	7,0b	9,0b
B770imi	A205V	7,0b	6,0b	9,0b	5,0b	2,0b	6,0b	w.d.	9,0b
RW-B	W574L	0,0a	0,0a	0,0a	0,0a	0,0a	2,0a	0,0a	2,0a
MS		108,6*** 0,68	103,9*** 0,4558	135,21*** 0,4558	70,36*** 0,4558	103,4*** 0,0001	41,9*** 0,68	58,4*** 0,72	42,0*** 0,54
LSD									

FIG. 5

Tabla 3

Proporción herbicida	F1		F2		Proporción evaluada	X2 valor p	BC1F1		Proporción evaluada	X2 valor p
	R	S	R	S			R	S		
80 g a.i. ha-1	22	0	520	0	-	-	280	0	-	-
320 g a.i. ha-1	18	0	381	127	3:1	0,837	151	146	1:1	0,77

FIG. 6

Tabla 4

F2	Número de					
	plantas	A/A	A/B	B/B	Segregación de haplotipo	
S	30	0	0	30		
R	81	26	55	0		
BC1F1						
S	62	0	0	62		
R	64	0	64	0		

FIG. 7

ATGGCGGCTCCTCCCAACCCTTCCATCTCCTTCAAACCACCGTCACCCGCCGCCGCA
 CTGCCACCACGCTCCGCCTTCCTCCCCCGTTTCGCATTACCCATCACTTCCACTACCC
 AAAAACGACACCGTCTTCACATCTCCAATGTTCTCTCCGACTCCAAATCCACCACCA
 CCACCACCACCACCACTCAACGACCGTTACCGGTGCAGCCTTTTGTCTCCCGTTACG
 CGCCAGATCAACCGAGAAAAGGCGCAGACGTGTTGGTGGAAGCTCTAGAACGGGAA
 GGTGTCACCGACGTATTCGCCTACCCCGGCGGCGCGTCAATGGAGATCCACCAAGCT
 CTCACGCGCTCAAACACTATCCGCAATGTCCTCCCCCGTCACGAACAGGGCGGCGTG
 TTCGCCGCCGAAGGCTACGCACGCGCCTCCGGTCTTCCCGGCGTGTGTATCGCCACT
 TCCGGTCTGGAGCTACGAACCTAGTTAGTGGTCTTGCTGACGCGCTGTTAGACAGT
 GTCCCATGGTGGCAATCACCGGTCAAGTTCCCGGAGAATGATCGGAACCGATGC
 GTTTCGAAGAAACCCCAATTGTTGAGGTAACACGTTTCGATTACTAAACATAATTATCT
 TGTGTTGGATGTTGAGGATATTCAGAAATAGTTCGTGAGGCTTTTATCTTGCGAGC
 TCGGGTCGACCCGGCCCCGGTTTTGATAGATGTACCGAAAGATATACAGCAACAGTTA
 GTGGTGCCGAAATGGGATGAACCGATGAGGTTACCGGGTTATTTGTCTAGAATGCCA
 AAGCCTCAATATGATGGGCATTTGGAACAGATTGTTAGGTTGGTGGGGGAAGCGAA
 GAGGCCGGTTTTGTATGTGGGTGGTGGGTGTTTGAATTCGGATGATGAGTTGAGCG
 GTTTGTGGGAGTTACGGGATTCGGGTGCGAGTACTTTGATGGGGCTCGGAGCGTA
 CCGGGCTTCGAGTGATTTGTGCTTCATATGCTTGGGATGCATGGTACGGTTTATGCG
 AATTATGCGGTTGATAAGAGTGATTTGTTGCTTGCCTTTGGGGTGCGGTTTGATGAC
 CGTGTGACGGGGAAGCTTGAGGCGTTTGCTAGTAGGGCGAAGATTGTTTATATTGAT
 ATTGATCCGGCTGAAATTGGGAAGAATAAACAGCCTCATGTGTGCTGTTTGTGGTGAT
 ATTAAGGTCGCGTTACAGGGTTTGAACAAGATTTTGGAGGAAAAGAATTCGGTGACT
 AATCTTGATTTTTTCGAACTGGAGAAAGGAATTGGATGAACAAAAAGTGAAGTTCCC
 GTTGAGCTTTAAACGTTTGGCGAAGCGATTCTCCACAGTATGCTATTCAAGTTCTT
 GATGAGTTAACGGGCGGGAATGCAATTATTAGCACCGGTGTCGGGCAACATCAGAT
 GTGGGCTGCTCAGTTTTACAAATACAACAAACCTAGACAATGGCTGACGTCGGGCG
 GGCTAGGGGCAATGGGTTTCGGCCTGCCCGCTGCTATCGGGGCGGCCGTTGCAAGAC
 CTGATGCGGTAGTAGTTGACATCGACCGGTGACGGAAGCTTTATGATGAATGTTCAAG
 AGTTAGCCACAATCCGTGTTGAAAATCTGCCGGTTAAGATTTTATTACTTAACAATC
 AGCATTTGGGTATGGTGGTTCAGTTGGAGGATCGGTTTTACAAGGCGAATCGGGCTC
 ATACCTACTTAGGAAACCCGTCAAAGAGTCGGAAATATTCCCTAACATGGTGAAGT
 TTGCTGAAGCCTGTGATATCCCGGCTGCTCGAGTGACCCAAAAGGCGGATCTACGAG
 CAGCTATTCAGAAGATGTTGGATACACCCGGGCCTTACTTGTTGGATGTCATTGTGC
 CGCATCAAGAACACGTGTTGCCATGATCCCGGCTGGCGGAGGTTTCTCGGATGTGA
 TCACCGAGGGTGATGGCAGAACGAAATATTGA

FIG. 8

MAAPPNPSISFKPPSPAALPPRSAFLPRFALPITSTTQKRHLHISNVLSDSKSTTTTTTTT
 QRPLPVQPFVSRYAPDQPRKGADVLVEALEREGVTDVFAYPGGASMEIHQALTRSNTIR
 NVLPRHEQGGVFAAEGYARASGLPGVCIATSGPGATNLVSGLADALLDSVPMVAITGQ
 VPRRMIGTDAFQETPIVEVTRSITKHNYLVLDVEDIPRIVREAFYLASSGRPGPVLIDVPK
 DIQQQLVVPKWDEPMRLPGYLSRMPKPQYDGHLEQIVRLVGEAKRPVLYVGGGCLNSD
 DELRRFVELTGIPVASTLMGLGAYPASSDLSLHMLGMHGTVYANYAVDKSDLLAFGV
 RFDDRVTGKLEAFASRAKIVHIDIDPAEIGKNKQPHVSICGDIKVALQGLNKILEEKNSVT
 NLDFSNWRKELDEQKVKPLSFKTFGEAIPPQYAIQVLDELTTGGNAIISTGVGQHQMWA
 AQFYKYNKPRQWLTSGGLGAMGFGLPAAIGA A VARPD AVVVDIDGDGSFMMNVQELA
 TIRVENLPVKILLNNQHLGMVVQLED RFYKANRAHTYLG NPSKESEIFPNMVKFAEAC
 DIPAAVRTQKADLRAAIQKMLDTPGPYLLDVIVPHQEHLVPMIPAGGGFSDVITEGDGRT
 KY

FIG. 9

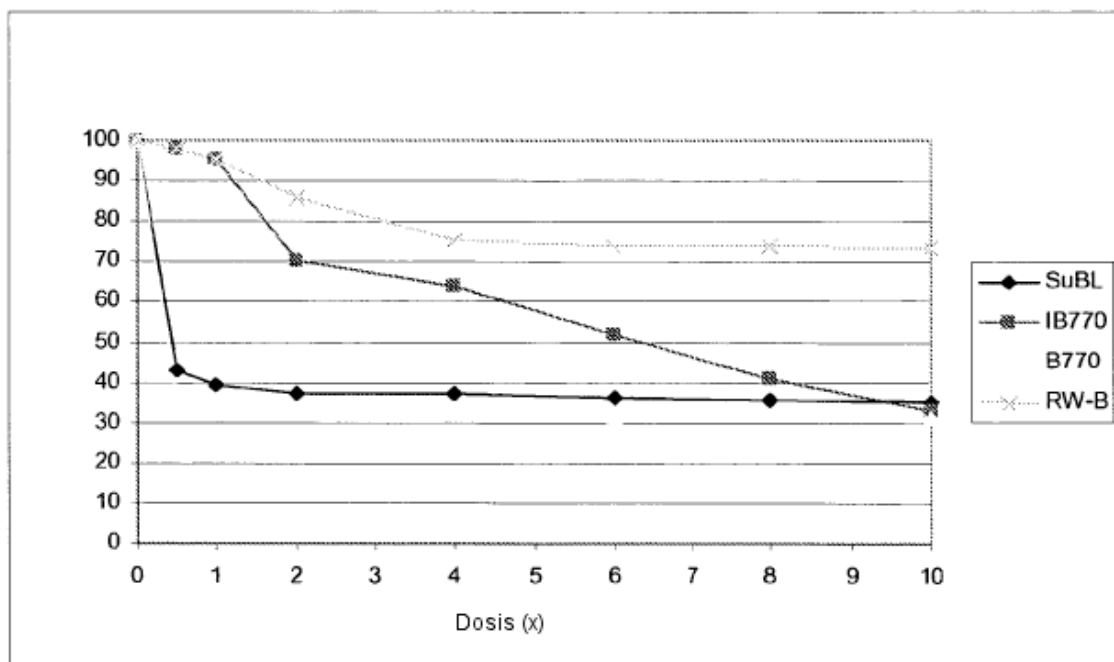


FIG. 10

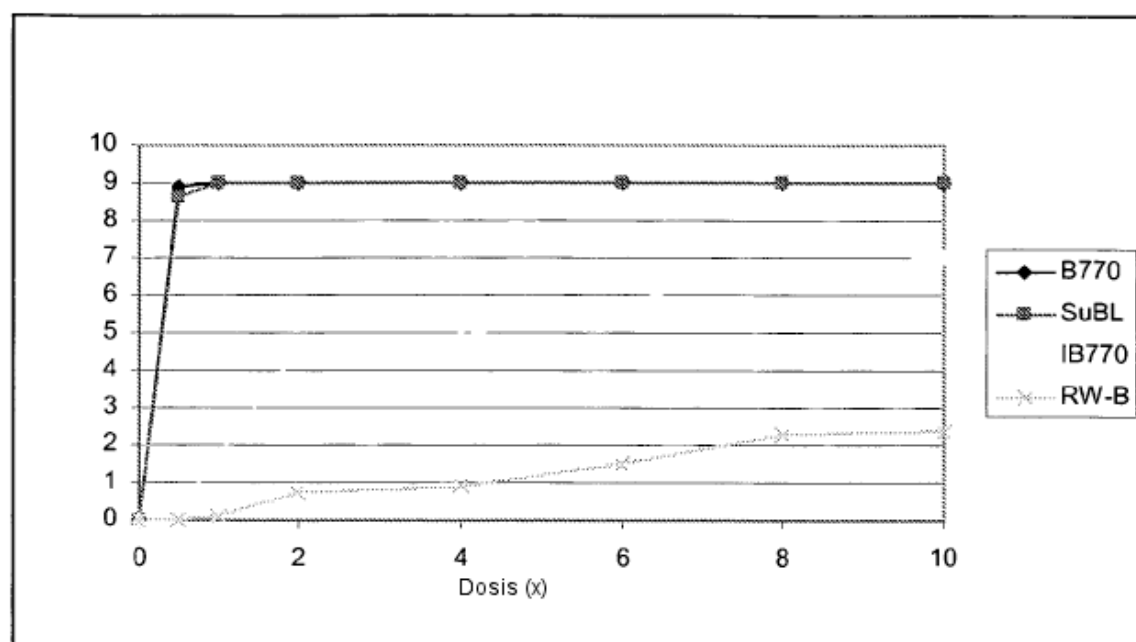


FIG. 11

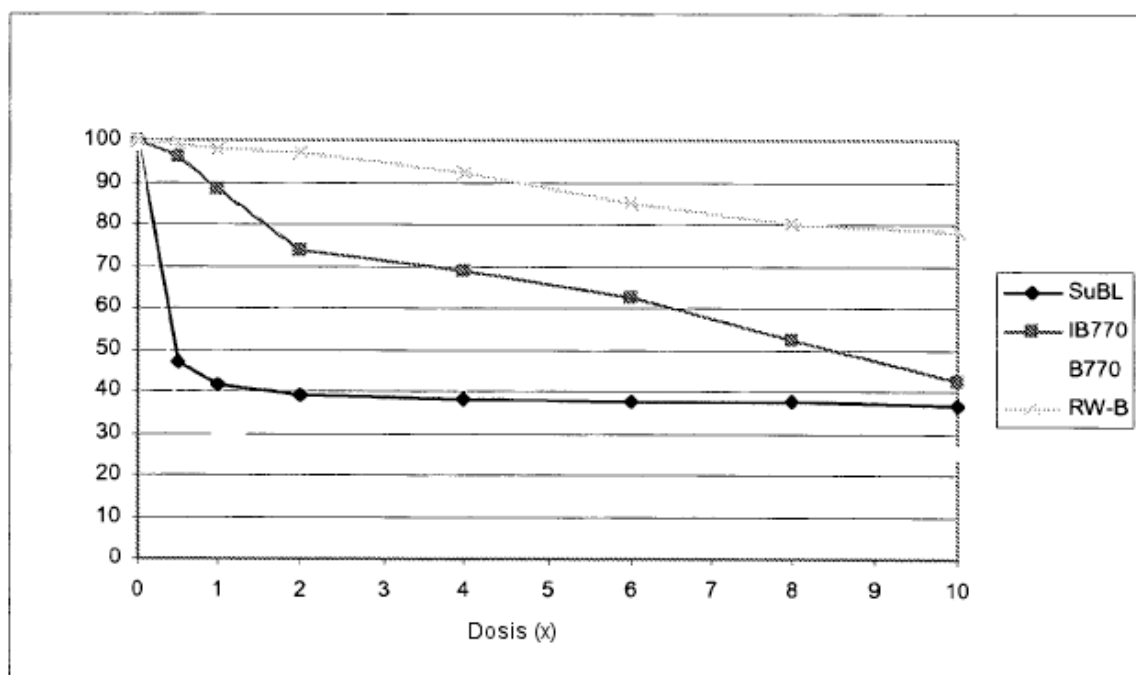


FIG. 12

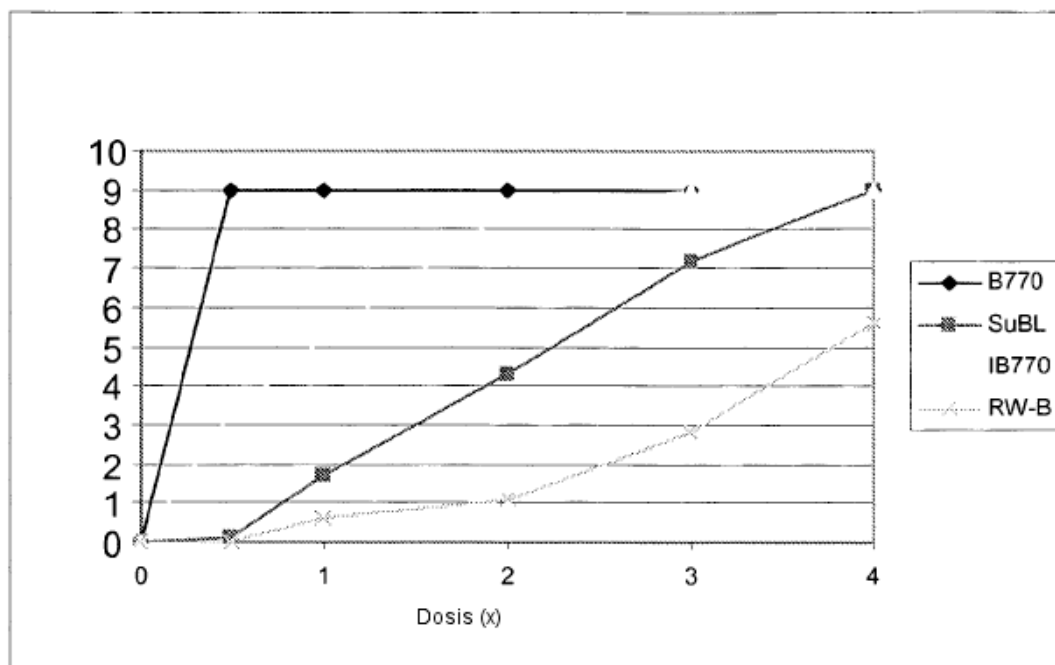


FIG. 13

